

Université de Sherbrooke

Protection et maintien des extrémités des chromosomes de
Saccharomyces cerevisiae

par

Michel Larrivée

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D.) en microbiologie

30 janvier 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-25913-9

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-25913-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	I
Liste des figures	IV
Liste des abréviations	V
Résumé	VII
Introduction	1
La découverte des télomères	1
L'ADN télomérique	2
La région double-brin	2
L'extrémité 3' simple-brin	3
Les régions sous-télomériques	5
L'hétérochromatine télomérique et ses composantes	7
Le télosome chez la levure	7
La structure télomérique chez l'humain	9
La protection des chromosomes	10
Protection des télomères par des protéines	
liant l'extension 3' G-riche	12
Pot1 : un orthologue fonctionnel aux télomères	14
Maintien des télomères par la télomérase	16
Le problème de la réplication des extrémités	16
La réplication coordonnée aux télomères	18
La télomérase chez la levure	21

La régulation de la taille des télomères	22
Les différences entre les deux extrémités d'un chromosome	26
Maintien des télomères en absence de la télomérase	30
Le maintien alternatif des télomères chez la levure	30
L'allongement des télomères sans télomérase chez l'humain	37
La connexion entre les télomères et les cassures d'ADN db	39
Objectifs du projet	43
Article I	44
Préambule	44
Article II	67
Préambule	67
Article III	103
Préambule	103
Discussion	138
La structure terminale des chromosomes chez <i>S.cerevisiae</i>	138
L'hétérodimère yKu et les extrémités des chromosomes	139
Le complexe MRX aux télomères	145
La complicité des complexes aux télomères	154
La caractérisation des survivants de type I et de type II	156
La survie en absence de Cdc13p	168
Adaptation des cellules en absence de Cdc13p	170
Structure télomérique particulière des survivants	174
Conclusion	177

Remerciements	178
Références	179
Annexe	216

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Organisation de l'ADN télomérique chez différents eucaryotes.	3
Figure 2. Schéma d'un télomère de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
Figure 3. Structures proposées des télomères chez la levure et chez l'humain.	9
Figure 4. Le problème de la réplication des extrémités.	18
Figure 5. Mécanismes potentiels pour le maintien des télomères en absence de la télomérase.	33
Figure 6. Formation des molécules d'ADN circulaires extra- chromosomiques sb G-riches et/ou partiellement db.....	162

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D	à deux dimensions
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ALT	«alternative lengthening of telomeres»; allongement alternatif des télomères
ARS	«autonomously replicating sequences»; origine de réplication autonome
BIR	«break-induced replication»; réplication induite après une cassure
C	cytosine
CHEF	«clamped homogeneous electric field»; électrophorèse à champs pulsés
db	double-brin
G	guanine
kpb	kilo paire de bases
MRX	Mre11/Rad50/Xrs2
NHEJ	«non-homologous end-joining»; réparation par jonction d'extrémités d'ADN non-homologues
nt	nucléotide
pb	paire de bases
sb	simple-brin

t-loop	«telomere-loop»; boucle formée au télomère
TPE	«telomere position effect»; effet positionnel du télomère
TRD	«telomere rapid deletion»; délétion rapide des séquences télomériques
TRF	«telomeric restriction fragment»; fragment terminal de restriction
Wt	de type sauvage

RÉSUMÉ

Les extrémités des chromosomes eucaryotes, appelées les télomères, sont composées de protéines et de courtes séquences de nucléotides répétées en tandem. Chez la majorité des organismes, le brin d'ADN se terminant à l'extrémité du chromosome en 3' est un brin contenant plusieurs bases guanine (G-riche), alors que le brin complémentaire est toujours le brin riche en cytosine. Un des rôles importants que jouent les télomères dans la cellule est qu'ils protègent les chromosomes contre la dégradation et les événements de fusion des extrémités des chromosomes. Dans le but d'identifier des facteurs importants dans le maintien des télomères, nous avons tout d'abord identifié un complexe protéique s'associant aux télomères de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, appelé yKu70 et yKu80. Cet hétérodimère était connu comme étant un joueur important pour la réparation des cassures d'ADN double-brin (db) via un mécanisme de réparation par jonction d'extrémités d'ADN non-homologues (NHEJ). La présence du complexe yKu aux télomères est surprenante du fait qu'il doit jouer un rôle antagoniste aux extrémités des chromosomes (empêcher les fusions télomère-télomère) par rapport aux cassures d'ADN db (permettre la fusion des bouts d'ADN sectionnés). De plus, nous avons démontré que le complexe yKu est important pour protéger la structure normale des télomères. En effet, les télomères des souches mutantes possèdent de longues extensions 3' télomériques.

Par ailleurs, il avait été démontré que les télomères de levure acquièrent de longues extensions 3' simple-brin (sb) de plus de 25 bases à la fin de la phase S. Cependant,

pour le reste du cycle cellulaire, la structure terminale n'était pas connue. Nous avons démontré dans un deuxième manuscrit que la levure possède des extensions 3' télomériques à l'extérieur de la phase S, soit en phase G₁ du cycle cellulaire. Ces extensions du brin G-riche ont une taille de 12 à 14 bases pour des cellules de type sauvage (Wt). De plus, nous avons démontré que le complexe Mre11/Rad50/Xrs2 est important pour former et/ou maintenir ces extensions. En effet, une délétion de l'un ou l'autre de ces gènes provoque une structure terminale différente par rapport à des cellules Wt. Ces mutants ont de courtes extensions 3' télomériques, la majorité étant moins de 8 bases, suggérant que ce complexe est important mais pas essentiel pour créer une structure terminale normale.

En absence de la télomérase, un faible pourcentage des cellules réussissent à survivre après 50-80 générations, préservant alors leurs séquences télomériques par des mécanismes de recombinaison. Deux types de survivants ont été décrits, soit les survivants de type I et de type II. Nous avons démontré que les deux types de survivants possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques différents : les survivants de type I possèdent majoritairement des cercles d'ADN db contenant une ou deux répétitions de l'élément sous-télomérique Y', alors que les survivants de type II possèdent des cercles d'ADN partiellement sb du brin G-riche. Ces cercles d'ADN extra-chromosomiques pourraient servir de réservoir afin de maintenir les télomères par des mécanismes de recombinaison. Nous avons aussi démontré que des cellules qui maintiennent alternativement leurs télomères peuvent survivre en absence de Cdc13p, une protéine normalement essentielle chez la levure et qui joue un rôle de

protection aux télomères. Ces survivants indépendants de Cdc13p possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques, démontrent des extrémités anormales des chromosomes et semblent avoir un système de surveillance («checkpoint») aboli. Cependant, la réintroduction de Cdc13p dans ces cellules renverse certains phénotypes, suggérant ainsi que les cellules se sont adaptées à l'absence d'une protection conventionnelle des télomères et que Cdc13p aurait un rôle important à jouer au niveau d'un mécanisme «anti-checkpoint» aux extrémités des chromosomes.

Mots clés généraux : télomères, télomérase, levure, recombinaison, adaptation.

INTRODUCTION

La découverte des télomères

C'est dans les années 1930 que les extrémités des chromosomes eucaryotes ont commencé à être étudiées. Tout d'abord, les travaux du généticien Hermann J. Muller ont démontré que les extrémités des chromosomes chez la drosophile sont des éléments stables (Muller, 1938). Il observa que les extrémités d'ADN résultant des cassures à l'intérieur des chromosomes sont très instables lorsque des cellules sont irradiées aux rayons X et des événements de délétion et d'inversion sont retrouvés. Par contre, les extrémités des chromosomes, qui sont en fait similaires à des cassures d'ADN double-brin (db), ne démontrent pas d'événements d'instabilité génétique dans des conditions normales. Muller en a conclu que la stabilité chromosomique était due à la présence d'une structure spéciale à la fin des chromosomes, qu'il a appelée télomère. Ce terme est dérivé de la langue Grecque : *telos* signifie «fin» et *meros* désigne «partie». Par la suite, ce sont les travaux de Barbara McClintock sur le maïs qui ont mené à une même conclusion. Elle a démontré que des chromosomes endommagés étaient très réactifs et fusionnaient entre eux, alors que les extrémités naturelles des chromosomes étaient stables (McClintock, 1939; McClintock, 1941). Ces premiers travaux ont donc apporté l'idée que les télomères doivent être différents des extrémités d'ADN produites lors des cassures des chromosomes, ces dernières ne permettant pas une protection efficace contre les réarrangements chromosomiques. Les travaux subséquents dans ce domaine ont alors permis de confirmer que les

extrémités des chromosomes eucaryotes forment des structures nucléoprotéiques spécialisées dans les cellules.

L'ADN télomérique

LA RÉGION DOUBLE-BRIN

Les séquences télomériques sont composées de courtes répétitions de nucléotides en tandem. Ces séquences d'ADN non-codantes forment un motif qui est relativement conservé entre les espèces. En effet, le brin d'ADN allant du centromère en 5' vers l'extrémité du chromosome en 3' possède plusieurs bases guanines (G) dans les séquences télomériques, appelé ainsi le brin riche en G (ou G-riche) (revue dans Chakhparonian et Wellinger, 2003). Le brin complémentaire, allant de l'extrémité 5' vers l'intérieur du chromosome en 3', est par conséquent riche en cytosines (C). Les premières identifications des séquences télomériques ont été réalisées chez les organismes ciliés *Tetrahymena* et *Oxytricha* (Blackburn et Gall, 1978; Klobutcher et al., 1981). Les répétitions télomériques sont généralement de 5 à 26 paires de bases (pb) chez ces espèces et forment la partie db des télomères. Les séquences précises et la taille des télomères varient selon les organismes, allant de 14 pb chez les ciliés à 100 kilo paires de bases (kpb) chez les souris (Figure 1). D'autre part, le nombre de répétitions télomériques retrouvé chez un même organisme peut être variable d'un chromosome à un autre. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les télomères ont une longueur de 300 ± 75 pb et la séquence d'ADN db télomérique répétée est (TG)₁₋₆TG₂₋₃ / C₂₋₃A(CA)₁₋₆, couramment abrégée TG₁₋₃/C₁₋₃A (Shampay et al., 1984; Wang et Zakian, 1990).

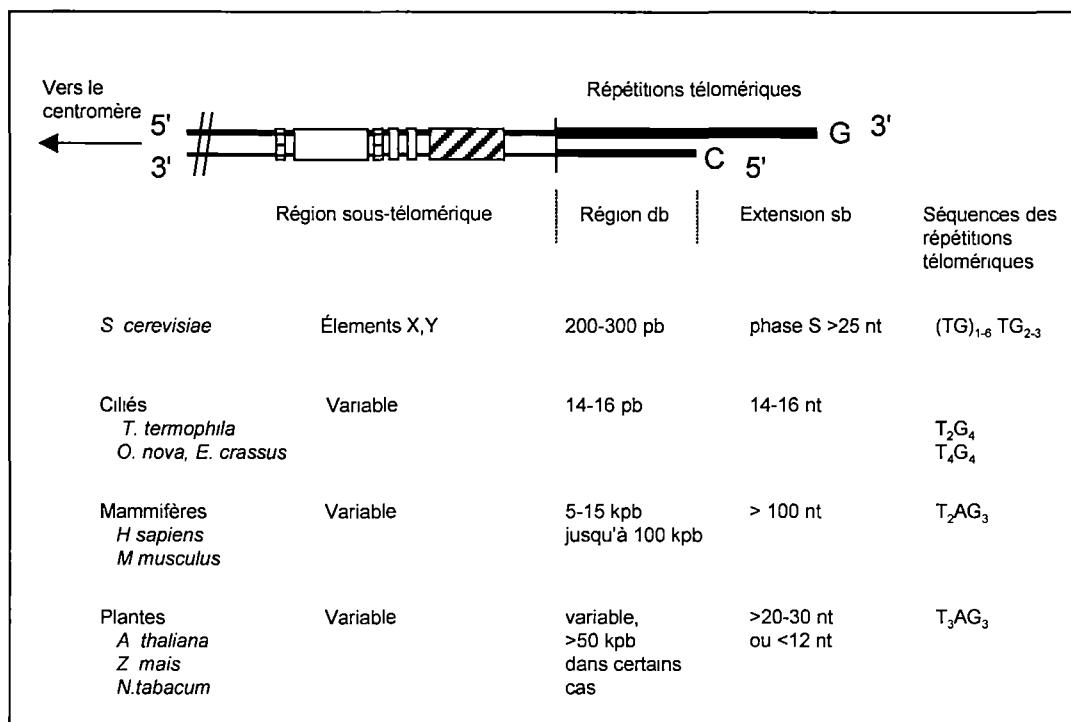


Figure 1. Organisation de l'ADN télomérique chez différents eucaryotes. Le brin C-riche est noté C, alors que le brin G-riche correspond à G. La région sous-télomérique est variable d'un organisme à un autre et peut comporter des éléments répétés (représentés par des rectangles). Le schéma n'est pas à l'échelle. Figure adaptée de Chakhparonian et Wellinger, 2003.

L'EXTRÉMITÉ 3' SIMPLE-BRIN

Un autre motif télomérique qui semble être conservé entre les organismes est la présence d'une extension 3' du brin G-riche. Chez les ciliés *Tetrahymena*, *Oxytricha* et *Euplotes*, les extensions 3' télomériques ont une taille se situant entre 14 et 16 nucléotides (nt) (Figure 1; Klobutcher et al., 1981; Pluta et al., 1982; Henderson et Blackburn, 1989). Une analyse moléculaire plus approfondie de la structure terminale chez *Tetrahymena* a permis de démontrer que la majorité des extensions simple-brin (sb) du brin G-riche ont une taille de 14-15 ou 20-21 nt (Jacob et al., 2001). De plus, ces extensions sont présentes aux deux extrémités des chromosomes et ne démontrent

que de légères variations de leur longueur tout au long du cycle cellulaire (Jacob et al., 2001). Des évidences directes de la présence d'extensions 3' télomériques ont été rapportées par microscopie électronique chez un autre protozoaire, soit *Trypanosoma brucei* (Munoz-Jordan et al., 2001). Ces extensions seraient de 75 à 225 nt sur les minichromosomes, mais de plus petites extensions pourraient également exister chez ce protozoaire. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les télomères acquièrent de longues extensions du brin G-riche de plus de 25 bases à la fin de la phase S seulement (Wellinger et al., 1993b; Wellinger et al., 1996). Ces extensions se retrouvent aux deux extrémités d'un plasmide linéaire, et probablement au niveau des chromosomes. Cependant, la présence d'extensions 3' chez la levure pour le reste du cycle cellulaire demeurerait encore inconnue due aux limites des techniques employées. Pour les télomères des chromosomes humains, des extensions 3' du brin G-riche seraient présentes tout au long du cycle cellulaire et seraient de longueur variant de 150 à 350 nt selon le type cellulaire étudié (Makarov et al., 1997; McElligott et Wellinger, 1997; Wright et al., 1997). Cependant, la présence de ces extensions aux deux extrémités des chromosomes humains ou à un seul des deux bouts demeure encore un sujet controversé selon les différents résultats obtenus. La présence d'extensions 3' télomériques a aussi été rapportée chez d'autres vertébrés, tels que le poulet et la souris (Venkatesan et Price, 1998; Hemann et Greider, 1999). Des extensions 5' du brin C-riche ont aussi été observées chez des cellules humaines, mais ces extensions ne seraient présentes que transitoirement en phase S et seraient dues à une réplication encore incomplète du brin G-riche aux extrémités (Cimino-Reale et al., 2003). Finalement, les chromosomes des plantes *Arabidopsis thaliana* et *Silene*

latifolia possèdent également des extensions 3' G-riches de plus de 20-30 bases (Riha et al., 2000). Cependant, chez l'espèce *Silene*, seulement la moitié des télomères auraient ces extensions sb, l'autre moitié des télomères auraient des extensions 3' de moins de 12 bases ou encore se termineraient en bout franc (Riha et al., 2000).

LES RÉGIONS SOUS-TÉLOMÉRIQUES

Chez la majorité des eucaryotes, la région adjacente aux télomères, appelée région sous-télomérique, est composée d'une combinaison de répétitions variées selon les organismes (Henderson, 1995). Ces régions sous-télomériques sont souvent non-similaires entre les différentes extrémités des chromosomes, de même qu'entre les espèces, de telle sorte qu'il n'y a pas de séquences d'ADN conservées entre les organismes. Les régions sous-télomériques les mieux caractérisées sont celles retrouvées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Chez cet organisme, il y a la présence de deux classes d'éléments sous-télomériques : les éléments Y' et X (Figure 2; Chan et Tye, 1983a; Chan et Tye, 1983b; Walmsley et al., 1984; Louis et Haber, 1992). L'élément Y' peut avoir deux grandeurs différentes, soit de 5,2 kpb ou 6,7 kpb, et il est retrouvé sur environ le deux tiers des télomères de levures. Il y a la présence d'un site de restriction pour l'endonucléase *XhoI* dans la séquence Y' (Figure 2). Ainsi, la taille des télomères chez la levure peut être analysée après digestion de l'ADN génomique avec *XhoI*, ce qui libère un fragment terminal de restriction (appelé TRF) d'environ 1,2 kpb (~300 pb de séquences télomériques + ~900 pb de séquences Y') pour des cellules de type sauvage (Wt). Chaque extrémité des chromosomes peut contenir normalement jusqu'à quatre copies de l'élément Y'.

Il est à noter que ces éléments possèdent une région contenant de courtes répétitions télomériques de levure qui séparent en quelque sorte chacun des éléments sous-télomériques. Lorsque l'élément Y' est présent à une extrémité d'un chromosome, il est toujours juxtaposé aux séquences télomériques.

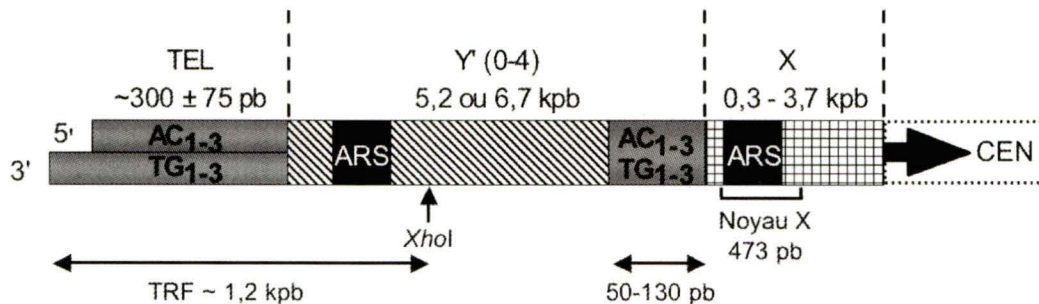


Figure 2. Schéma d'un télomère de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le télomère (identifié TEL) se retrouve à l'extrémité du chromosome, suivi par les régions sous-télomériques Y' (0 à 4 copies) et X respectivement (voir la description dans le texte). La digestion de l'ADN génomique par *XhoI* libère un fragment terminal de restriction (identifié TRF) d'environ 1,2 kpb pour des cellules Wt. CEN signifie le centromère du chromosome. La figure n'est pas à l'échelle.

L'élément répété X, quant à lui, se retrouve en une seule copie sur toutes les extrémités des chromosomes de la levure, dans la région la plus près du centromère (région distale du télomère). Ainsi, les régions X se retrouvent soit juxtaposées à un élément Y' ou soit directement à côté d'un télomère lorsque la région Y' n'est pas présente. L'élément sous-télomérique X est d'une longueur hétérogène, qui varie de 0,5 à 3,75 kpb (Figure 2). Cependant, chacun possède une région partagée (appelée noyau X) par tous les télomères qui est de 473 pb (Louis et al., 1994; Pryde et al., 1997). Tous les éléments X et Y' possèdent une origine de réplication (appelée ARS : «autonomously replicating sequences») qui peut être utilisée en phase S. Ces régions

ne semblent toutefois pas être essentielles chez la levure puisque ce ne sont pas toutes les extrémités qui possèdent un élément Y' et que des chromosomes artificiels de levures peuvent être maintenus sans élément sous-télomérique (Wellinger et Zakian, 1989). Chez la levure, les éléments sous-télomériques semblent être impliqués dans l'établissement de l'architecture nucléaire, dans le potentiel répressif de la chromatine télomérique et dans le maintien des télomères par des mécanismes de recombinaison (Lundblad et Blackburn, 1993; Pryde et al., 1997; Pryde et Louis, 1999). Toutefois, les rôles précis des éléments sous-télomériques dans les cellules eucaryotes restent encore à être mieux définis.

L'hétérochromatine télomérique et ses composantes

LE TÉLOSOME CHEZ LA LEVURE

La structure de la chromatine retrouvée aux extrémités des chromosomes chez *S.cerevisiae* a déjà été analysée par des digestions à la nucléase micrococcalle (MNase) et à la DNase I (Wright et al., 1992). Il a ainsi été démontré que les éléments sous-télomériques X et Y' possèdent un arrangement nucléosomale similaire au reste du chromosome, mais que les répétitions télomériques ne sont pas liées par les histones. Cette structure non-nucléosomale, appelée télosome, serait principalement composée des protéines Rap1p liées aux répétitions télomériques TG₁₋₃/C₁₋₃A (Conrad et al., 1990). *RAP1* («repressor activator protein 1») est un gène essentiel dont la protéine est requise pour l'activation et la répression de certains gènes chez la levure (revue dans Shore, 1994; Shore, 1997). La liaison de Rap1p aux séquences télomériques a été démontrée par des expériences d'immunoprécipitation de la

chromatine (Conrad et al., 1990; Wright et al., 1992; Strahl-Bolsinger et al., 1997) et par microscopie à fluorescence où une colocalisation de Rap1p et des télomères est observée (Gotta et al., 1996). De plus, Rap1p serait présent sur l'ADN télomérique à environ toutes les 18 pb (Gilson et al., 1993). La partie C-terminale de Rap1p interagit avec les protéines Sir3p et Sir4p (Moretti et al., 1994). Ces protéines Sir («silent information regulator») interagissent à leur tour avec la protéine Sir2p, et il a été démontré que ce complexe (Sir2-3-4p) se retrouve aux télomères de levure (Gotta et al., 1996; Strahl-Bolsinger et al., 1997). Par ailleurs, le complexe Sir2-3-4p se lie aux nucléosomes présents dans les régions sous-télomériques via l'interaction des protéines Sir3p et Sir4p avec les histones hypoacétylées H3 et H4 (Hecht et al., 1995; Strahl-Bolsinger et al., 1997). Des travaux subséquents ont permis de proposer une structure de repliement des télomères de levure sur les régions sous-télomériques via des interactions entre Rap1p, Sir2-3-4p et les nucléosomes (Figure 3A; Strahl-Bolsinger et al., 1997; Grunstein, 1998; de Bruin et al., 2000; de Bruin et al., 2001). Cette forme d'hétérochromatine télomérique serait probablement responsable de la répression transcriptionnelle de gènes positionnés près d'un télomère, phénomène appelé TPE («telomere position effect»). Le TPE a d'abord été observé chez la levure lorsque des gènes transcrits par l'ARN polymérase II ont été insérés près d'un télomère (Gottschling et al., 1990). Il y a seulement deux exemples de TPE qui ont été rapportés pour des gènes positionnés dans un contexte naturel (Vega-Palas et al., 1997; Vega-Palas et al., 2000). Le TPE est également observé chez d'autres organismes tels la levure *Schizosaccharomyces pombe*, des protozoaires, *Drosophila melanogaster* et chez l'humain (revue dans Tham et Zakian, 2002).

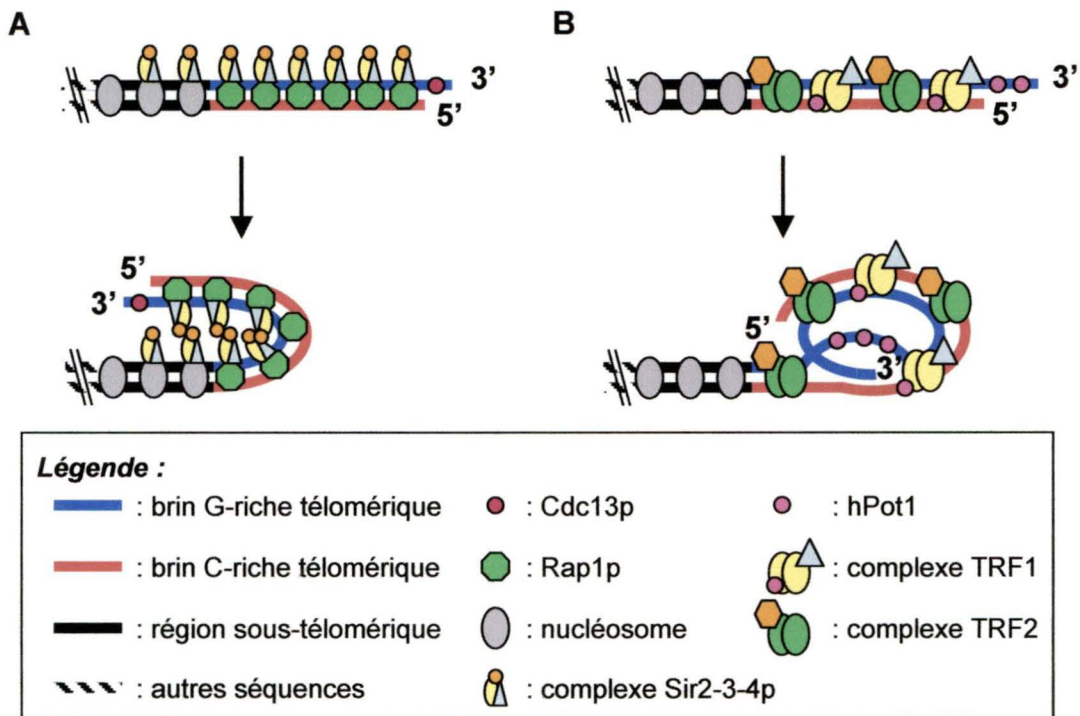


Figure 3. Structures proposées des télomères chez la levure et chez l'humain. **A)** Chez la levure *S.cerevisiae*, le repliement de l'ADN télomérique sur les régions sous-télomériques se réalise par l'intermédiaire des protéines Rap1, Sir2-3-4p et des nucléosomes. **B)** Chez l'humain, la formation du t-loop se réalise par l'invasion de l'extension 3' simple-brin télomérique dans une région double-brin télomérique, ce qui déplace une partie du brin G-riche. Les complexes protéiques TRF1 et TRF2 se lient à l'ADN télomérique et permettent la formation d'un t-loop. Les schémas ne sont pas à l'échelle.

LA STRUCTURE TÉLOMÉRIQUE CHEZ L'HUMAIN

Pour les télomères humains, ce sont principalement les protéines TRF1 et TRF2 («TTAGGG-repeat-binding factor») qui se lient aux répétitions télomériques T₂AG₃/C₃TA₂ (Chong et al., 1995; Billaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997). TRF1 et TRF2 se retrouvent comme étant les points centraux pour l'élaboration d'une chromatine télomérique chez l'humain puisqu'elles interagissent avec différentes protéines afin de former des complexes (revue dans Smogorzewska et de Lange, 2004; de Lange, 2005). L'orthologue de Rap1p chez l'humain, hRap1, ne lie pas

directement l'ADN télomérique, mais sa localisation aux télomères est dépendante de son interaction avec TRF2 (Li et al., 2000). Une configuration particulière des télomères chez les mammifères a été découverte par microscopie électronique, proposant un nouveau modèle d'une structure terminale des chromosomes appelée t-loop («telomeric-loop») (Griffith et al., 1999). Le t-loop est le résultat de l'invasion de l'extension 3' du brin G-riche dans les répétitions d'ADN db télomériques, déplaçant ainsi le brin T₂AG₃ et formant une boucle (Figure 3B). Ce brin déplacé correspond à une longueur d'environ 150 nt, suggérant que la majorité des nucléotides formant l'extension terminale 3' sont appariés avec le brin complémentaire C₃TA₂ (Griffith et al., 1999). TRF2 semble être impliqué dans la formation des t-loops du moins *in vitro* (Griffith et al., 1999; Stansel et al., 2001). La structure télomérique t-loop semble être un motif relativement conservé au cours de l'évolution. Outre l'humain et la souris, cette structure est aussi retrouvée au niveau des télomères chez le cilié *Oxytricha fallax*, chez le protozoaire *Trypanosoma brucei*, chez le pois *Pisum sativum* et chez le poulet (Murti et Prescott, 1999; Munoz-Jordan et al., 2001; Cesare et al., 2003; Nikitina et Woodcock, 2004). Par contre, il n'y a aucune information quant à la présence ou non de t-loops aux télomères des levures *S.cerevisiae* et *S.pombe*. Certaines raisons techniques semblent être la cause de ce manque d'information (revue dans de Lange, 2004).

La protection des chromosomes

Une des fonctions importantes que les télomères doivent jouer au niveau des chromosomes linéaires est celle permettant de les distinguer des cassures d'ADN db.

Afin de protéger les chromosomes contre des événements de recombinaison, les télomères ne doivent pas être reconnus comme étant un dommage dans l'ADN, ce qui pourrait alors être néfaste pour les cellules. Ainsi, leurs fonctions de protection permettent de masquer les télomères des points de contrôles (appelés «checkpoints») dans la cellule et d'éviter la dégradation des séquences d'ADN des chromosomes par des nucléases. En plus des premières observations de la stabilité des télomères par Muller et McClintock, des études chez la levure *S.cerevisiae* ont clairement démontré le rôle de protection des télomères (Sandell et Zakian, 1993). L'utilisation d'une souche haploïde avec deux copies d'un même chromosome a permis de démontrer que l'absence d'un télomère sur un chromosome provoque un arrêt du cycle cellulaire, tout comme un seul bris d'ADN à l'intérieur d'un chromosome (Sandell et Zakian, 1993; Lee et al., 1998). Cet arrêt dans le cycle cellulaire est dépendant de Rad9p, une protéine largement impliquée dans le «checkpoint» des dommages à l'ADN chez la levure (Weinert et Hartwell, 1988; Sandell et Zakian, 1993). Par contre, les cellules peuvent surpasser après un certain temps cet arrêt sans réparer le chromosome dépourvu d'un télomère, un phénomène appelé adaptation. En effet, elles peuvent réaliser quelques divisions cellulaires en répliquant et en ségréguant le chromosome tronqué avant de perdre complètement ce dernier (Sandell et Zakian, 1993; Toczyski et al., 1997). Ces données ont donc permis de conclure que les télomères servent à protéger les chromosomes contre leur dégradation et ainsi, à la stabilité génomique.

PROTECTION DES TÉLOMÈRES PAR DES PROTÉINES LIANT L'EXTENSION 3' G-RICHE

Certaines protéines s'associant aux télomères sont responsables du rôle de protection des chromosomes contre les événements de dégradation. Chez *S.cerevisiae*, un des facteurs clés pour contribuer à ce rôle est la protéine Cdc13p. Le gène *CDC13* («cell division cycle») est essentiel chez la levure et son produit résulte en une protéine de 924 acides aminés. Cdc13p est une protéine liant des molécules d'ADN télomériques sb G-riches avec une très haute affinité *in vitro*, suggérant fortement sa liaison aux extensions 3' G-riches *in vivo* chez la levure (Lin et Zakian, 1996; Nugent et al., 1996). La séquence minimale de liaison de Cdc13p sur un oligonucléotide est d'une longueur de 11 nt et correspond à la séquence dGTGTGGGTGTG (Hughes et al., 2000b). Des expériences de simple-hybride et d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré la localisation de Cdc13p aux télomères *in vivo* (Bourns et al., 1998; Tsukamoto et al., 2001). L'utilisation d'un mutant contenant un allèle thermosensible *cdc13-1* a permis de démontrer le rôle de protection de Cdc13p aux télomères (Garvik et al., 1995). En effet, lorsqu'incubées à une température restrictive, une dégradation du brin C-riche survient dans les cellules *cdc13-1*, permettant alors de détecter de longues extensions du brin G-riche. Ces cellules arrêtent dans le cycle cellulaire en phase G₂ de façon dépendante à Rad9p, de sorte que les doubles mutants *cdc13-1 rad9Δ* meurent rapidement à température restrictive, probablement dû à une perte de gènes essentiels lors de la dégradation de l'ADN (Weinert et al., 1994; Garvik et al., 1995). Cdc13p forme un complexe aux télomères de levure avec les protéines Stn1p («suppressor of cdc thirteen») et Ten1p («telomeric pathways in association with Stn1»), leur association avec Cdc13p ayant

été démontré par double-hybride (Grandin et al., 1997; Grandin et al., 2001). Curieusement, les gènes *STN1* et *TEN1* sont essentiels et lorsque des souches ayant des allèles thermosensibles de ces gènes sont incubées à température restrictive, elles arrêtent en phase G₂ et démontrent aussi la présence d'extensions 3' sb télomériques (Grandin et al., 1997; Grandin et al., 2001). Finalement, il a été démontré que l'utilisation d'une protéine chimérique comprenant Stn1p et le domaine de liaison à l'ADN de Cdc13p permet de compléter la viabilité d'une souche *cdc13Δ* (Pennock et al., 2001). Ainsi, le complexe Cdc13p/Stn1p/Ten1p serait important et essentiel pour la protection des chromosomes chez *S.cerevisiae*.

Chez d'autres espèces, les protéines liant les extensions 3' sb semblent être également importantes pour les fonctions télomériques. En effet, le premier exemple de l'existence de protéines spécifiques pour les télomères a été rapporté chez *Oxytricha nova*. Chez ce cilié, chaque télomère se termine par une extension 3' G-riche et la protéine TEBP, composée des sous-unités α et β , se lie efficacement sur ce substrat d'ADN sb télomérique (Gottschling et Zakian, 1986). La sous-unité α reconnaît spécifiquement les séquences télomériques de l'extension 3' et la sous-unité β stabilise le complexe ADN-protéine. La structure cristalline du dimère TEBP α/β démontre que le complexe incorpore et cache l'extension 3' télomérique dans une grande poche hydrophobe (Horvath et al., 1998; Horvath et Schultz, 2001). *In vitro*, TEBP α/β protège l'extrémité télomérique de la dégradation par la nucléase Bal31 (Gottschling et Zakian, 1986), mais des limites expérimentales chez le cilié ne permettent pas une étude approfondie du complexe *in vivo*. Malgré le fait que Cdc13p

chez la levure n'a pas d'homologie de séquences avec TEBP α , ces deux protéines semblent exercer le même rôle de protection des télomères et la structure en solution de Cdc13p a révélé un motif structural OB («oligonucléotide/oligosaccharide binding») qui est conservé entre ces deux complexes lorsque liés aux molécules d'ADN télomérique sb (Murzin, 1993; Horvath et al., 1998; Horvath et Schultz, 2001; Mitton-Fry et al., 2002).

POT1 : UN ORTHOLOGUE FONCTIONNEL AUX TÉLOMÈRES

Une protéine orthologue de TEBP α a été identifiée chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* par homologie de séquences (Baumann et Cech, 2001). Pot1 («protection of telomeres») est une protéine liant spécifiquement des répétitions télomériques G-riches sb *in vitro*. La délétion du gène *pot1*⁺ résulte en la perte rapide et complète des séquences télomériques chez cette levure. La croissance des cellules *pot1*⁻ est très lente et la majorité des cellules meurent après environ 10 générations, probablement due à une dégradation des séquences d'ADN à l'intérieur des chromosomes. En réalisant le même type de comparaison de séquences, Baumann et Cech ont identifié l'orthologue de Pot1 chez l'humain (Baumann et Cech, 2001). En plus de se lier spécifiquement aux séquences télomériques humaines G-riches sb *in vitro*, dont la séquence minimale de liaison est de 9 nt (Baumann et Cech, 2001; Lei et al., 2003; Loayza et De Lange, 2003; Lei et al., 2004), la caractérisation de hPot1 a permis de démontrer sa position aux télomères dans les cellules humaines (Baumann et al., 2002), la présence de motifs OB dans la protéine (Lei et al., 2003; Lei et al., 2004), et la présence d'homologue chez d'autres organismes, incluant des vertébrés,

plantes et levures (Baumann et al., 2002; Wei et Price, 2004). Des données récentes supportent l'implication de hPot1 dans la protection des télomères. En effet, une diminution de l'expression de hPot1 dans les cellules par interférence à l'ARN (RNAi) cause l'apoptose ou la sénescence dans les cellules, tout comme des événements de fusion de chromosomes par association des télomères (Veldman et al., 2004; Yang et al., 2005). Curieusement, ces fusions télomère-télomère causées par une perte de protection sont également observées dans des cellules surexprimant une protéine TRF2 dominante négative (appelée TRF2^{ΔBAM}) ou lorsque TRF1 est absent aux télomères (van Steensel et al., 1998; Iwano et al., 2004). Récemment, il a été démontré que la réduction de hPot1 dans les cellules cause une perte des extensions 3' télomériques, un phénotype préalablement observé lors de la surexpression de TRF2^{ΔBAM} (van Steensel et al., 1998), et que la surexpression de hPot1 supprime les instabilités génétiques et la sénescence associées à la surexpression de TRF2^{ΔBAM} (Yang et al., 2005). Ces données suggèrent donc que hPot1 agit avec TRF2 dans la protection des chromosomes humains. La découverte récente d'une protéine interagissant avec hPot1, appelée PTOP/PIP1/TINT1 par trois groupes de recherche indépendants (d'où la présence de trois noms différents pour la même protéine), a permis de complexifier les interactions entre les protéines télomériques humaines (Houghtaling et al., 2004; Liu et al., 2004; Ye et al., 2004b). En effet, PTOP/PIP1/TINT1 est une protéine qui interagit aussi avec TIN2 (Houghtaling et al., 2004; Liu et al., 2004; Ye et al., 2004b), TIN2 étant une protéine qui interagit avec les protéines TRF1 et TRF2 (Kim et al., 1999; Kim et al., 2004; Ye et al., 2004a). Ainsi, un réseau d'interactions complexes entre les protéines est retrouvé aux télomères

humains, ce qui pourrait favoriser la formation d'un t-loop stable et permettre une protection accrue des télomères chez l'humain (revue dans Colgin et Reddel, 2004).

Maintien des télomères par la télomérase

LE PROBLÈME DE LA RÉPLICATION DES EXTRÉMITÉS

En plus de les obliger à se doter d'un système de protection des extrémités, la présence de chromosomes linéaires chez les cellules eucaryotes apporte une seconde complication : la réplication des extrémités. Initialement postulé par Olovnikov et Watson (Watson, 1972; Olovnikov, 1973), ce problème est relié aux faits que les ADN polymérases conventionnelles nécessitent une amorce d'ARN de 8-16 nt pour initier la synthèse de l'ADN et qu'elles synthétisent l'ADN dans une orientation 5' vers 3' seulement. Lors de la synthèse du brin retardé, l'amorce d'ARN positionnée à une extrémité du chromosome doit être enlevée, ce qui crée un trou («gap») dans l'ADN à cet endroit (Figure 4A, molécule d'ADN nouvellement synthétisée *I*). Le brin d'ADN nouvellement synthétisé (appelé brin fille) est alors plus court que le brin d'ADN ayant servi de matrice (appelé brin parental), mais la structure et la longueur sont similaires à la molécule initiale (Figure 4A). Le problème de réplication survient lors de la synthèse du brin avancé aux télomères. Puisque le brin parental servant de matrice est déjà plus court, la synthèse du brin avancé forme une molécule d'ADN plus courte que la molécule initiale (Figure 4A, molécule d'ADN nouvellement synthétisée *II*). De plus, cette nouvelle molécule d'ADN synthétisée se termine par une extrémité franche, ce qui est à l'origine d'un autre problème discuté un peu plus loin (voir la section *LES DIFFÉRENCES ENTRE LES DEUX EXTRÉMITÉS D'UN CHROMOSOME*).

Lorsque cette nouvelle molécule d'ADN sera utilisée comme matrice lors d'une prochaine phase de réplication, les molécules filles produites seront également plus courtes. Ainsi, après chaque cycle de réplication, des séquences d'ADN télomériques seront perdues d'une longueur d'au moins la taille des amorces d'ARN utilisées pour générer les fragments d'Okazaki à l'extrémité du chromosome. S'il n'y a pas de mécanisme pour remédier à ce problème, les télomères ne pourront plus exercer leurs fonctions après quelques divisions cellulaires, ce qui causera un arrêt de la croissance et/ou des événements d'instabilité génétique.

C'est une ribonucléoprotéine, appelée télomérase, qui permet de remplir la deuxième fonction des télomères chez la majorité des eucaryotes, soit de permettre la réplication complète des chromosomes. La télomérase est constituée de protéines associées à une molécule d'ARN et forme un complexe enzymatique actif (revue dans Smogorzewska et de Lange, 2004). Les composantes minimales du complexe actif *in vitro* sont la protéine catalytique TERT («telomerase reverse transcriptase») et l'ARN TERC («telomerase RNA component»). TERT est une transcriptase inverse qui utilise TERC pour ajouter des répétitions télomériques en 3' du chromosome. En effet, TERC possède une petite région qui correspond à la version ARN du brin C-riche télomérique et qui sert donc de matrice à la transcriptase inverse. De cette façon, la télomérase allonge seulement l'extension 3' télomérique du brin G-riche, et ce sont les ADN polymérases conventionnelles qui synthétiseront le brin C-riche lors de la synthèse du brin retardé (Figure 4B).

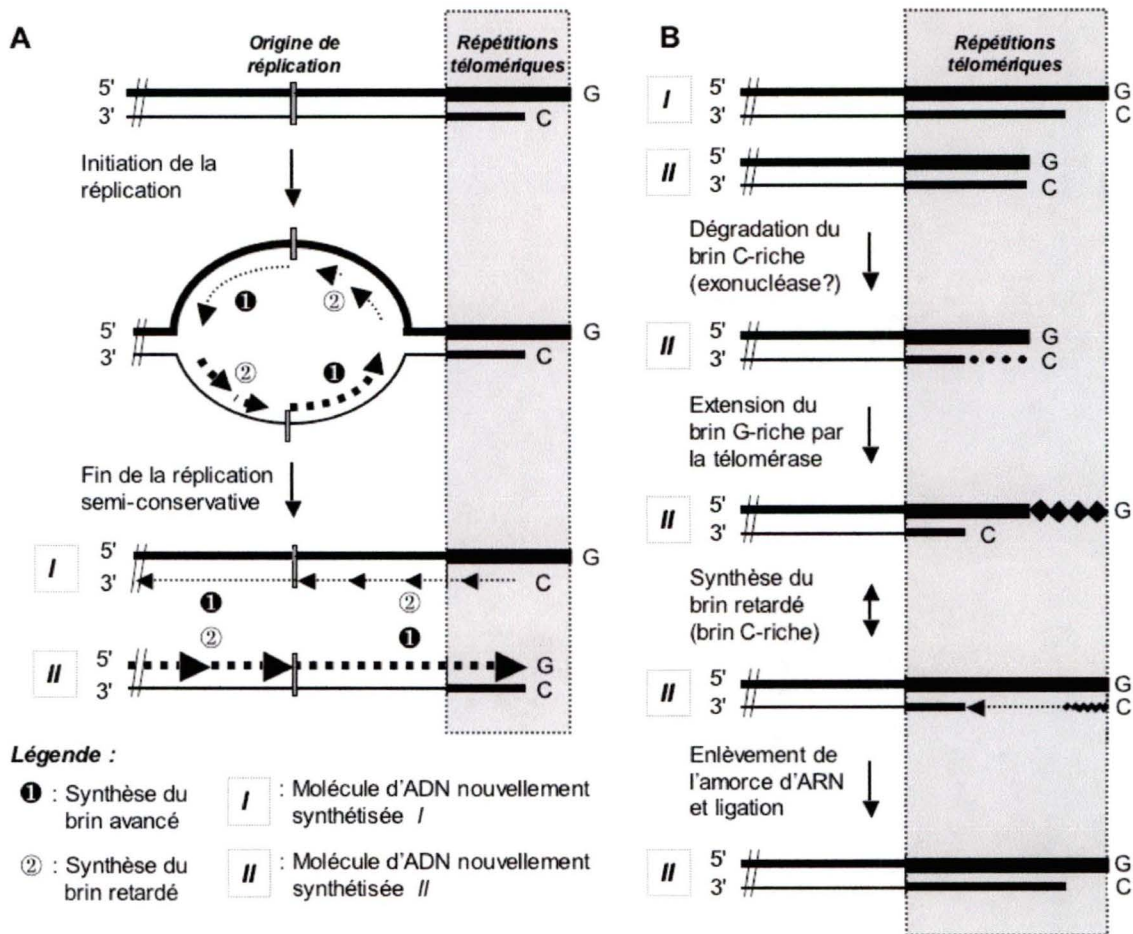


Figure 4. Le problème de la réplication des extrémités. **A)** Lors de la réplication semi-conservative de l'ADN, la synthèse du brin avancé va toujours créer le brin G-riche (trait plus épais) au niveau des télomères alors que la synthèse du brin retardé va créer le brin C-riche (trait plus mince). Lorsque la synthèse est complétée, deux molécules d'ADN nouvellement synthétisée seront produites, dont la molécule *II* qui sera plus courte à une extrémité que la molécule parentale et qui se terminera par un bout franc. **B)** Schéma agrandi des deux molécules d'ADN nouvellement synthétisées. L'extrémité de la molécule *II* devra subir différentes étapes de transformation afin de conserver la taille initiale des répétitions télomériques et une structure terminale normale. Note : les processus d'élongation du brin G-riche et la synthèse du brin C-riche se font d'une façon coordonnée (identifiés par une flèche à double-sens; voir la description dans le texte).

LA RÉPLICATION COORDONNÉE AUX TÉLOMÈRES

Due à la polarité des brins d'ADN télomériques, la synthèse du brin avancé est toujours responsable de la duplication du brin riche en G, alors que la synthèse du brin riche en C nécessite les composantes de la machinerie de la synthèse du brin

retardé (Figure 4A). Chez la levure *S.cerevisiae*, la réplication des télomères se fait de façon tardive durant la phase S (Wellinger et al., 1993a; Wellinger et al., 1993b; Wellinger et al., 1993c). De même, des analyses de l'élongation des télomères par la télomérase à différentes phases du cycle cellulaire ont démontré que l'enzyme serait active à la fin de la phase S (Diede et Gottschling, 1999; Marcand et al., 2000). Les deux événements de réplication se retrouvent donc dans la même période du cycle cellulaire, suggérant un lien entre les deux processus. Ce lien a été renforcé par des données obtenues chez la levure *S.cerevisiae* et chez le cilié *Euplotes crassus*. Tout d'abord, Cdc13p chez la levure s'associe physiquement avec la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase α , Pol1p, impliquée dans la synthèse du brin retardé (Qi et Zakian, 2000). Stn1p quant à lui se lie également à une autre sous-unité de l'ADN polymérase α , soit Pol12p (Grossi et al., 2004). De plus, des souches de levure ayant un allèle mutant de l'ADN polymérase α ont des télomères plus longs que des cellules Wt, l'élongation des télomères étant dépendante de la télomérase (Carson et Hartwell, 1985; Adams et Holm, 1996). De longues extensions 3' télomériques sont observées lorsque des souches de levure possédant l'allèle thermosensible *pol1-17* ont poussé à température semi-permissive (Adams Martin et al., 2000). Ces extensions ne sont détectables que lorsque les cellules passent en phase S et elles sont dépendantes d'une télomérase fonctionnelle (Adams Martin et al., 2000). Ces données suggèrent ainsi une coordination importante entre l'ajout de répétitions télomériques par la télomérase et la synthèse du brin retardé par la machinerie conventionnelle de réplication afin de réguler la taille des télomères. Des résultats démontrant que la longueur des télomères est partiellement rétablie lorsque Stn1p est

surexprimé dans des cellules contenant des allèles mutants pour l'ADN polymérase α suggèrent également que Cdc13p coordonnerait la synthèse des deux brins télomériques (Chandra et al., 2001). Dans le même ordre d'idée, une délétion du gène *RAD27* chez la levure, dont la protéine encodée est une nucléase impliquée dans la maturation des fragments d'Okazaki, cause une hétérogénéité dans la taille des télomères et la présence de longues extensions 3' télomériques partiellement dépendantes de la télomérase (Parenteau et Wellinger, 1999; Parenteau et Wellinger, 2002). Finalement, l'inactivation de l'ADN polymérase α , l'ADN primase ou l'ADN polymérase δ (une polymérase responsable de l'allongement des fragments d'Okazaki initié par l'ADN polymérase α) inhibe l'élongation des télomères dépendante de la télomérase lors de la formation *de novo* d'un télomère (Diede et Gottschling, 1999). De la même façon, les télomères formés *de novo* chez *Euplotes crassus* sont influencés par l'absence des ADN polymérases α et δ (Fan et Price, 1997). L'inhibition de ces enzymes cause une augmentation de la longueur des extensions 3' G-riche et une dérégulation dans la longueur du brin C-riche. D'une façon similaire à *S.cerevisiae*, le complexe ADN polymérase α / ADN primase interagit avec le complexe de la télomérase chez le cilié, renforçant une fois de plus le lien existant dans la régulation de la synthèse des brin G- et C-riches télomériques (Ray et al., 2002). Ainsi, l'élongation du brin G-riche par la télomérase et la synthèse du brin C-riche par la machinerie de réplication seraient donc des processus coordonnés et qui surviennent dans un même cadre temporel (Figure 4B).

LA TÉLOMÉRASE CHEZ LA LEVURE

Les principales composantes de la télomérase chez *S.cerevisiae* ont été découvertes par des criblages génétiques indépendants, soit les protéines encodées par les gènes *EST1*, *EST2*, *EST3* et *CDC13/EST4* («ever shorter telomeres») (Lundblad et Szostak, 1989; Lendvay et al., 1996), et le gène *TLC1* («telomerase component 1») encodant la composante ARN du complexe (Singer et Gottschling, 1994). La délétion des gènes *EST1*, *EST2*, *EST3*, *TLC1* ou la présence de l'allèle *cdc13-2^{est}* (allèle du gène initialement nommé *EST4*) dans la cellule résulte aux mêmes phénotypes cellulaires, soit la perte en moyenne de 3 à 5 pb des séquences télomériques par division cellulaire et une sénescence cellulaire entre 60 à 100 générations (Lundblad et Szostak, 1989; Singer et Gottschling, 1994; Lendvay et al., 1996). Cette sénescence est principalement causée par la perte de fonction de protection des télomères, ce qui mène à des instabilités génétiques dans la cellule, tels des événements de délétions, réarrangements chromosomiques et fusions de chromosomes (Hackett et al., 2001). Cependant, l'activité de la télomérase *in vitro* ne requiert que la protéine Est2p, qui correspond à la composante catalytique, et l'ARN matrice TLC1 (Cohn et Blackburn, 1995; Counter et al., 1997; Lingner et al., 1997). La protéine Est3p se lie à TLC1 de façon dépendante à la présence de Est2p, mais aucune autre fonction jusqu'à présent n'a été démontrée pour cette protéine (Hughes et al., 2000a). Est1p se lie également à TLC1 (Lin et Zakian, 1995; Zhou et al., 2000a; Livengood et al., 2002) et à de l'ADN sb télomérique TG₁₋₃ *in vitro* (Virta-Pearlman et al., 1996). Contrairement à Cdc13p, Est1p se lie à son substrat télomérique avec moins d'affinité et requiert une extension 3' libre pour se lier, suggérant que cette protéine se retrouve à la toute fin de

l'extension 3' télomérique (Virta-Pearlman et al., 1996). De plus, Est1p et Cdc13p interagissent ensemble, proposant le modèle que Cdc13p recrute la télomérase aux télomères via son interaction avec Est1p (Qi et Zakian, 2000; Pennock et al., 2001). Ce modèle de recrutement est supporté par le fait que l'expression de la protéine de fusion Cdc13-Est2p ne requiert plus Est1p pour le maintien des télomères par la télomérase (Evans et Lundblad, 1999). Toutefois, ce modèle semble être un peu plus complexe qu'anticipé. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de démontrer que Est2p est lié aux télomères en phases G₁ et S, alors que Est1p se lie seulement à la fin de la phase S (Taggart et al., 2002), soit la phase du cycle cellulaire à laquelle la télomérase est active chez la levure (Marcand et al., 2000). Même si les protéines Est1p et Est2p se retrouvent aux télomères dans un mutant *cdc13-2^{est}* et que la protéine mutante Cdc13-2p interagit physiquement avec Est1p (Qi et Zakian, 2000; Taggart et al., 2002), une interaction fonctionnelle serait absente entre la protéine mutante Cdc13-2p et Est1p, ce qui permet d'expliquer l'absence d'activité de la télomérase chez le mutant *cdc13-2^{est}* (Pennock et al., 2001). Ainsi, le nouveau modèle proposé est que Est1p serait un régulateur positif de la télomérase; il se lie aux télomères à la fin de la phase S et il activerait alors le complexe de la télomérase qui était déjà associé aux télomères (Taggart et al., 2002).

LA RÉGULATION DE LA TAILLE DES TÉLOMÈRES

Chez la majorité des organismes ayant une télomérase fonctionnelle, les télomères sont maintenus de façon stable avec une longueur définie selon l'espèce. Par ailleurs, la longueur de chacun des télomères dans une même cellule se retrouve normalement

similaire. Cette régulation de la taille des télomères, mécanisme qui reste encore à être mieux défini, doit résulter d'une balance entre des événements de raccourcissement des séquences télomériques et d'élongation des télomères par la télomérase. Chez *S.cerevisiae*, la télomérase n'allonge pas simultanément tous les télomères contenus dans une cellule (Teixeira et al., 2004). En effet, il a été démontré que la télomérase agit sur une petite fraction des télomères à l'intérieur d'un seul cycle cellulaire et c'est un nombre variable de répétitions télomériques qui sont ajoutées sur les télomères d'une façon indépendante de leur taille (Teixeira et al., 2004). Bien que ce processus survienne de façon stochastique dans la cellule, la télomérase chez la levure semble avoir une préférence d'action sur les télomères plus courts (Teixeira et al., 2004). Par ailleurs, le complexe Cdc13p-Stn1p aurait un rôle à jouer au niveau de l'inhibition de l'élongation du brin G-riche par la télomérase. En effet, une souche de levure contenant l'allèle *cdc13-5* possède de très longs télomères et des extensions 3' télomériques très longues en phase S, tout comme une souche mutante pour le gène *STN1* (Grandin et al., 1997; Chandra et al., 2001). La surexpression de Stn1p dans la souche *cdc13-5* permet de rétablir les phénotypes au niveau Wt (Chandra et al., 2001). De plus, la protéine mutante Cdc13p exprimée dans une souche *cdc13-2^{est}*, la même mutation qui abolit l'association fonctionnelle entre Cdc13p et la télomérase, n'interagit plus avec Stn1p (Chandra et al., 2001). Ainsi, la protéine Cdc13p pourrait être impliquée dans le recrutement et/ou l'activation de la télomérase, coordonner la synthèse du brin retardé et inhiber l'action de la télomérase à l'aide de Stn1p. D'autre part, l'hélicase 5'→ 3' Pif1p jouerait un rôle dans la régulation de la longueur des télomères via son action inhibitrice de la télomérase. Il a

été démontré que des mutations dans le gène *PIF1* résultent en l'allongement de la taille des télomères dépendants de la télomérase, alors que la surexpression de Pif1p dans les cellules provoque un raccourcissement des télomères (Schulz et Zakian, 1994; Zhou et al., 2000b). Récemment, il a été démontré que Pif1p réduit la processivité de la télomérase *in vitro* et que la surexpression de Pif1p diminue l'association de la télomérase aux télomères *in vivo* (Boule et al., 2005). Un autre type de mécanisme de régulation de la taille des télomères a été proposé chez la levure *S.cerevisiae*. Il s'agit d'un mécanisme de recombinaison qui enlève rapidement des séquences télomériques d'un télomère, appelé TRD («telomere rapid deletion») (Li et Lustig, 1996). Le TRD permet à un télomère plus long de revenir à une taille similaire aux autres télomères dans la cellule par un processus de délétion des répétitions télomériques via la recombinaison intrachromatide, formant alors une structure similaire à celle proposée pour les t-loops (Li et Lustig, 1996; Bucholtz et al., 2001).

D'un autre côté, lorsque les télomères sont allongés par la télomérase et que le brin complémentaire est synthétisé, la région double-brin télomérique augmente en taille, ce qui crée des nouveaux sites de liaisons pour des protéines télomériques spécifiques. Chez la levure *S.cerevisiae*, un mécanisme de comptage des protéines Rap1p a d'abord été proposé afin de réguler négativement la taille des télomères (Marcand et al., 1997). En utilisant des sites additionnels de liaison pour Rap1p près d'un télomère, Marcand *et al.* ont démontré que lorsqu'un nombre adéquat de sites de liaison pour Rap1p a été formé sur les télomères de levure et que Rap1p s'y lie, il y a

alors une inhibition de l'élongation des télomères (Marcand et al., 1997). Plus particulièrement, la partie C-terminale de Rap1p interagit avec les protéines Rif1p et Rif2p («Rap1-interacting factor») et la délétion d'un de ces gènes non-essentiels résulte en l'augmentation de la taille des télomères de 100 à 300 pb de plus que des cellules Wt (Hardy et al., 1992; Wotton et Shore, 1997). Des souches doubles mutantes *rif1Δ rif2Δ* possèdent des télomères encore plus longs que les souches simples mutantes, suggérant une synergie entre les protéines (Wotton et Shore, 1997). Ainsi, les protéines Rif1p et Rif2p agiraient dans la cellule afin d'inhiber l'activité d'élongation des télomères par la télomérase via leur interaction avec Rap1p. Des données obtenues chez la levure *Kluyveromyces lactis* appuient le modèle de comptage dépendant des protéines Rap1p pour réguler la taille des télomères (Krauskopf et Blackburn, 1996; Krauskopf et Blackburn, 1998). Chez les mammifères, c'est la protéine TRF1 qui régulerait négativement la taille des télomères, de la même manière que Rap1p. La surexpression de TRF1 provoque un raccourcissement des télomères, alors qu'une inhibition partielle de TRF1 en utilisant une protéine mutante dominante-négative provoque une augmentation de la taille des télomères humains (van Steensel et de Lange, 1997; Smogorzewska et al., 2000). hPot1 interagit avec TRF1 et il semble avoir également un rôle à jouer dans la régulation de la taille des télomères (Loayza et De Lange, 2003). En effet, une version mutante de la protéine hPot1 (appelée POT1^{ΔOB}), ne contenant plus son domaine de liaison à l'ADN, est retrouvée malgré tout aux télomères humains (Loayza et De Lange, 2003). L'expression de POT1^{ΔOB} dans des cellules exprimant la télomérase réprime l'expression de hPot1 endogène et la taille des télomères

augmente rapidement dans ces cellules, suggérant une absence d'inhibition de la télomérase (Loayza et De Lange, 2003). De l'autre côté, hRap1 interagit avec TRF2 et l'expression de protéines tronquées de hRap1 dans les cellules démontre un phénotype d'élongation des télomères (Li et al., 2000; Li et de Lange, 2003). Ainsi, le complexe TRF1-POT1, avec le complexe TRF2, pourrait inhiber la télomérase par l'intermédiaire de la formation de la structure t-loop, empêchant ainsi l'accessibilité de l'enzyme à son substrat 3' télomérique. En accord avec ce propos, les expériences de liaison *in vitro* de hPot1 suggèrent que cette protéine est en mesure de se lier au brin G-riche déplacé lors de la formation du t-loop, ce qui pourrait ainsi stabiliser cette structure (Loayza et al., 2004). Par ailleurs, la protéine PINX1 est un autre inhibiteur de la télomérase qui a été découvert chez l'humain (Zhou et Lu, 2001). La surexpression de cette protéine inhibe l'activité de la télomérase, diminue la taille des télomères et provoque une crise cellulaire (Zhou et Lu, 2001). L'homologue de PINX1 chez la levure (yPinX1p, appelé aussi Gno1p) peut aussi inhiber la télomérase *in vitro* et sa surexpression diminue la taille des télomères chez la levure, indiquant que cet inhibiteur serait conservé entre les deux espèces (Lin et Blackburn, 2004). Malgré toutes ces données, la compréhension du mécanisme exact du contrôle de la taille des télomères reste encore à être mieux éclaircie.

LES DIFFÉRENCES ENTRE LES DEUX EXTRÉMITÉS D'UN CHROMOSOME

Lors de la réplication semi-conservative de l'ADN, la synthèse du brin avancé est responsable de former le brin G-riche et est supposée créer un bout franc à ce télomère nouvellement répliqué (Figure 4A). Cette prédiction est supportée par des

expériences utilisant un système de réplication *in vitro* qui reconstitue le problème de réplication des extrémités (Ohki et al., 2001). Ainsi, sur le même chromosome, les deux extrémités seraient différentes à la fin de la réplication semi-conservative; le télomère répliqué par la synthèse du brin avancé se terminerait par un bout franc, alors que le télomère répliqué par la synthèse du brin retardé aurait une extension 3' sb (Figure 4A). La présence d'une structure terminale différente entre les télomères chez les plantes, et peut-être chez l'humain, supportent cette idée (Makarov et al., 1997; Riha et al., 2000). Puisque les protéines liant les extensions 3' sb télomériques semblent être essentielles pour le maintien de l'intégrité des télomères, le bout franc généré au télomère lors de la synthèse d'ADN doit être traité par une exonucléase et/ou une endonucléase couplée avec une hélicase afin de produire une extension 3' sb (Figure 4B). Ces événements de traitements différents et supplémentaires d'un des deux télomères d'un chromosome sont supportés par des évidences obtenues chez la levure et chez l'humain (Bailey et al., 2001; Parenteau et Wellinger, 2002). Plus particulièrement chez la levure *S.cerevisiae*, de longues extensions 3' sb télomériques de plus de 25 nt sont détectées de façon indépendante à la télomérase à la fin de la phase S, lorsque les télomères sont répliqués (Wellinger et al., 1993a; Wellinger et al., 1993b; Dionne et Wellinger, 1996; Wellinger et al., 1996). Ces extensions 3' se retrouvent aux deux extrémités d'un plasmide linéaire et nécessitent le passage de la fourche de réplication aux télomères afin d'être créées (Wellinger et al., 1996; Dionne et Wellinger, 1998). Ainsi, ces résultats suggèrent fortement qu'il doit y avoir une activité nucléase aux télomères afin de convertir le bout franc à une extrémité en une extension 3' sb. De plus, la création d'une extension 3' sb permet à la télomérase

d'agir sur ce télomère puisque la télomérase ne peut pas allonger un substrat télomérique se terminant avec un bout franc du moins *in vitro* (Lingner et Cech, 1996). Là où les protéines impliquées dans cette activité nucléase aux télomères ne sont pas encore clairement définies. L'extension d'ADN *sb* créée peut être par la suite allongée par la télomérase et de façon coordonnée, la réplication du brin C-riche peut survenir via la synthèse du brin retardé. Après la dégradation de l'amorce d'ARN du fragment d'Okazaki, une extension 3' *sb* est obtenue, créant ainsi une structure terminale similaire à celle retrouvée au niveau de l'autre télomère répliqué par la synthèse du brin retardé (Figure 4B). La longueur des deux télomères d'un chromosome peut également être préservée via cette synthèse d'ADN coordonnée aux télomères (Figure 4B).

Un candidat pour effectuer l'activité nucléase sur le bout franc est le complexe conservé Mre11p, Rad50p et Xrs2p, appelé le complexe MRX chez la levure et MRN chez l'humain (N étant pour la protéine Nbs1 chez l'humain, l'homologue à Xrs2) (revue dans D'Amours et Jackson, 2002). Ce complexe est impliqué dans la réparation des cassures d'ADN *db* par recombinaison homologue et, du moins chez la levure, de la réparation par jonction d'extrémités d'ADN non-homologues appelée NHEJ («non-homologous end joining»). Ce complexe semble avoir plusieurs fonctions dans la cellule, dont le rôle de «checkpoint» dans la phase S (revue dans D'Amours et Jackson, 2002). Le complexe Mre11 est requis dans le maintien de la taille des télomères puisque des mutations dans une ou des sous-unités du complexe provoquent le raccourcissement des télomères chez la levure (Kironmai et

Muniyappa, 1997; Boulton et Jackson, 1998; Nugent et al., 1998), chez les plantes (Gallego et White, 2001) et chez les mammifères (Ranganathan et al., 2001). La protéine Mre11p, seule ou en complexe, possède plusieurs activités nucléases telles exonucléases et endonucléases (revue dans D'Amours et Jackson, 2002). Cependant, des mutations dans le domaine nucléase de Mre11p chez la levure n'affectent pas la longueur des télomères (Moreau et al., 1999; Tsukamoto et al., 2001). Des résultats obtenus par des essais de formation de télomères *de novo* à la suite d'une cassure d'ADN db supportent l'idée que le complexe MRX serait responsable de générer des extensions 3' sb télomériques (Diede et Gottschling, 2001). En effet, l'absence du complexe MRX fonctionnel chez la levure résulte en la diminution considérable de la liaison de Cdc13p et de la formation d'un télomère près d'une cassure d'ADN db pour des cellules arrêtées en phase mitotique (Diede et Gottschling, 2001). Ainsi, la création d'un substrat d'ADN sb télomérique pour la télomérase et d'un site de liaison pour Cdc13p semble être altérée lorsque le complexe MRX est inactif. Par contre, des résultats contradictoires indiquent plutôt que le complexe serait important dans le recrutement de la télomérase (Tsukamoto et al., 2001). Ce sont des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine qui ont permis de démontrer que l'absence de Mre11p, Rad50p ou Xrs2p dans la cellule n'affecte pas la liaison de Cdc13p aux télomères de levure (Tsukamoto et al., 2001). Chez l'humain, le complexe MRN possède une activité hélicase qui est conférée par la protéine NBS1 (Paull et Gellert, 1999). Plus particulièrement, les protéines Mre11p et Rad50p sont associées de façon constitutive aux télomères humains, probablement en interagissant avec TRF2, alors que la protéine Nbs1p se retrouve associée aux télomères seulement

en phase S (Zhu et al., 2000). Cette liaison spécifique du complexe MRN avec les télomères en phase S suggère qu'il serait probablement important pour la réplication des télomères et/ou la formation du t-loop chez l'humain (Zhu et al., 2000).

Maintien des télomères en absence de la télomérase

LE MAINTIEN ALTERNATIF DES TÉLOMÈRES CHEZ LA LEVURE

Des cellules dépourvues d'activité de la télomérase perdent 3 à 5 pb à chaque télomère par division cellulaire chez la levure, dû au problème de réplication des extrémités (Lundblad et Szostak, 1989; Lundblad et Blackburn, 1993; Singer et Gottschling, 1994). La majorité des cellules entrent en sénescence après 50 à 100 générations et finissent par mourir à cause d'une dégradation terminale des séquences d'ADN. Ceci résulte en une perte de gènes essentiels et/ou des fusions de chromosomes provoquant une instabilité génétique (Hackett et al., 2001). Cependant, un faible pourcentage des cellules réussissent à échapper aux conséquences létales dues à l'absence d'une télomérase active (Lundblad et Blackburn, 1993). L'apparition de ces survivants est possible grâce à des événements de recombinaison dépendant de la protéine Rad52p, qui est normalement responsable de la majorité des événements de recombinaison homologue chez la levure (Lundblad et Blackburn, 1993). En effet, les survivants possèdent des changements importants au niveau des extrémités des chromosomes par rapport aux cellules Wt. Ces survivants sont classifiés en deux catégories selon le résultat de l'amplification par recombinaison des séquences télomériques et/ou des séquences sous-télomériques; ce sont les survivants de type I et les survivants de type II (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et

al., 1999; Teng et Zakian, 1999). L'analyse des extrémités des chromosomes des survivants de type I démontre une amplification des régions sous-télomériques Y' (Figure 5; Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999). En effet, le nombre total de copies de l'élément Y' retrouvé dans les survivants de type I est environ 200 fois plus élevé que celui retrouvé dans des cellules Wt. De même, des chromosomes n'ayant pas d'éléments Y' avant la sénescence se retrouvent avec ces éléments lorsque les cellules sortent de la crise et deviennent des survivants de type I, alors que normalement l'échange d'éléments Y' entre les télomères survient à un très faible pourcentage dans des cellules Wt (Horowitz et Haber, 1985). Même s'il y a une amplification des régions sous-télomériques, les télomères sont courts pour cette classe de survivants comparativement aux cellules Wt (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999). Leur taille est d'environ de 100 pb et elle semble être maintenue tout au long des générations des survivants de type I. En plus de la dépendance de Rad52p, des études génétiques ont permis de démontrer que la génération des survivants de type I est dépendante de la présence de d'autres protéines impliquées dans la recombinaison homologue, soit Rad51p, Rad54p et Rad57p (Le et al., 1999; Chen et al., 2001). D'un autre côté, les survivants de types II sont caractérisés par la présence de télomères de taille hétérogène, dont la majorité sont très longs comparativement à ceux des cellules Wt (Figure 5; Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999). Contrairement aux télomères des survivants de type I, les longs télomères hétérogènes des survivants de type II ne sont pas maintenus de façon stable et ne possèdent pas d'amplification des éléments Y' (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999). En effet,

ces télomères raccourcissent de génération en génération et sont par la suite allongés brusquement dans un court laps de temps (Teng et Zakian, 1999). À part la protéine Rad52p, les autres produits des gènes impliqués dans la recombinaison et dans la génération des survivants de type II sont Rad59p et le complexe MRX (Le et al., 1999; Teng et al., 2000; Chen et al., 2001). Du point de vue de la croissance cellulaire, les survivants de type II possèdent un temps de génération similaire aux cellules Wt, tandis que les survivants de type I ont une croissance plus lente, phénomène qui reste encore mal compris (Teng et Zakian, 1999). Ainsi, lorsque des cellules de survivants de type I sont mises en culture liquide, des survivants de type II peuvent alors apparaître dans la population, suggérant que les survivants de type I peuvent changer de mode pour générer des survivants de type II et que les survivants de type II ont un net avantage au niveau de la croissance cellulaire (Teng et Zakian, 1999). Finalement, il a été démontré que la remise en place d'une télomérase fonctionnelle dans les deux types de survivants inhibe les mécanismes de recombinaison utilisés pour maintenir les télomères et que ceux-ci reviennent à une taille similaire aux cellules Wt après quelques générations (Lundblad et Blackburn, 1993; Teng et Zakian, 1999). L'identification des voies génétiques empruntées pour générer les survivants chez la levure permet de prédire certains mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien des télomères en absence de la télomérase (revue dans Lundblad, 2002). Ainsi, les deux voies de recombinaison impliquent principalement le gène *RAD52*, et l'une des voies est dépendante de *RAD50* (pour générer les survivants de type II) tandis que l'autre voie est dépendante de *RAD51* (pour générer les survivants de type I) (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999).

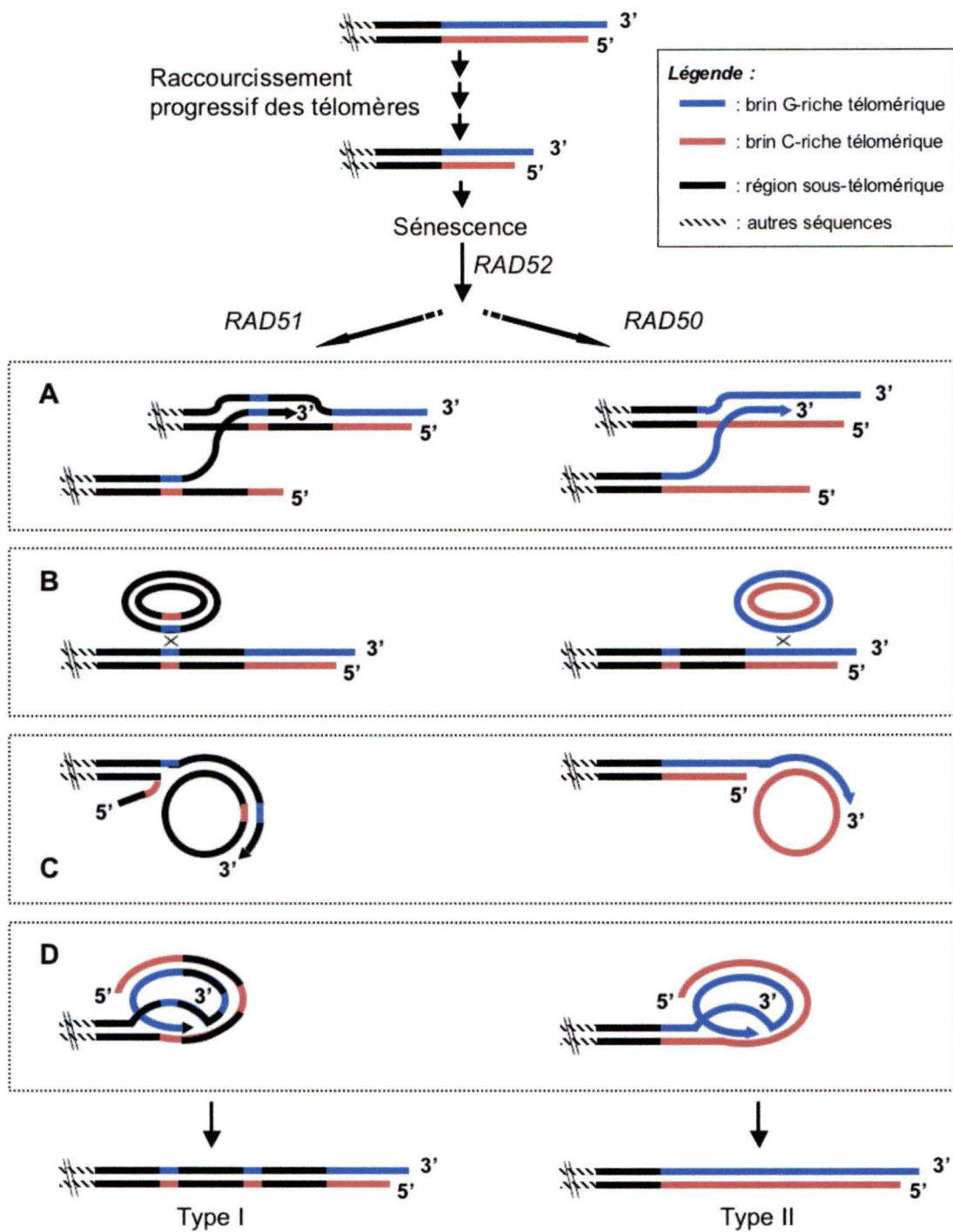


Figure 5. Mécanismes potentiels pour le maintien des télomères en absence de la télomérase. Dans des levures *S.cerevisiae* sans télomérase, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire. Même si la majorité des cellules entrent en sénescence, une faible proportion des cellules réussissent à former des survivants de type I ou type II selon des mécanismes proposés. **A)** Recombinaison inter-moléculaire de type BIR. **B)** Intégration de molécules d'ADN extra-chromosomiques. **C)** Mode de réplication en cercle roulant à partir de molécules circulaires d'ADN extra-chromosomiques. Des cercles d'ADN db pourraient également être impliqués. **D)** Recombinaison intra-chromosomique formant une structure similaire au t-loop.

Un premier mécanisme proposé pour le maintien des télomères en absence de la télomérase est celui impliquant des événements de recombinaison d'une extrémité qui initie une fourche de réplication, appelé BIR («break-induced replication») (Figure 5A; revue dans Kraus et al., 2001). Ainsi, un chromosome brisé sans télomère peut être rétabli en se recombinant de façon intra-chromosomique par homologies de séquences ou en recopiant l'extrémité d'un autre chromosome par réplication (Bosco et Haber, 1998). L'utilisation du mécanisme BIR entre des chromosomes non-homologues a été mise en évidence lorsque la télomérase n'est plus active dans les cellules de levures (Hackett et al., 2001). Les événements de BIR peuvent survenir de façon dépendante de *RAD51*, mais également de façon indépendante de *RAD51* (revue dans Kraus et al., 2001). Ainsi, les survivants de type I pourraient maintenir leurs télomères par un mécanisme de recombinaison BIR-dépendant de *RAD51*, alors que les survivants de types II pourraient utiliser un mécanisme de recombinaison BIR de façon indépendante de *RAD51* (Figure 5A).

Un autre mécanisme de recombinaison pourrait être l'intégration de molécules d'ADN extra-chromosomiques circulaires (Figure 5B). La présence de cercles d'ADN extra-chromosomiques constitués d'éléments Y' a déjà été rapportée chez la levure *S.cerevisiae* (Horowitz et Haber, 1985). Ce sont des molécules qui seraient créées par excision des régions Y' des chromosomes et qui pourraient ensuite se réintégrer dans des régions sous-télomériques de d'autres chromosomes. L'utilisation de ces cercles Y' d'ADN extra-chromosomiques par les survivants de type I pourrait expliquer le maintien des extrémités de leurs chromosomes (Figure 5B). Pour les

survivants de type II, des cercles d'ADN télomériques pourraient être utilisés de la même façon (Figure 5B). Par contre, leur présence n'a pas encore été identifiée et leur formation potentielle reste aussi à être étudiée.

Un troisième mécanisme pourrait également expliquer le maintien des télomères des survivants. Il s'agit encore de l'utilisation des cercles d'ADN extra-chromosomiques, mais le maintien des télomères se ferait par un mécanisme de réplication en cercle roulant (Figure 5C). L'extension 3' sb télomérique pourrait alors servir de point de départ pour les ADN polymérases. Ce mode de réplication a déjà été caractérisé chez des organismes ayant des petits génomes tels que les bactériophages et des plasmides bactériens (revue dans Novick, 1998).

Un dernier mécanisme qui pourrait être également à l'origine de la survie des cellules en absence de la télomérase est celui impliquant l'élongation des télomères par la formation d'une structure similaire au t-loop (Figure 5D). L'invasion et l'appariement de l'extension 3' sb G-riche pourraient se réaliser dans les régions sous-télomériques Y' ou directement dans les télomères et d'une façon similaire au BIR, pourraient maintenir les extrémités des chromosomes pour les survivants de type I et de type II respectivement (Figure 5D). Ce mécanisme pourrait ainsi expliquer la présence d'une élongation très rapide des télomères observée chez les survivants de type II (Teng et al., 2000).

Chez la levure à bourgeon *Kluyveromyces lactis*, la perte de la télomérase provoque aussi le raccourcissement progressif de la taille des télomères et une entrée des cellules en sénescence avant 100 générations (McEachern et Blackburn, 1995). La contribution de la recombinaison dans les régions sous-télomériques a été mise en évidence dans ces cellules dépourvues de télomérase, démontrant ainsi que les télomères courts sont plus sujets à ces événements de recombinaison, qui arrivent jusqu'à 1000 fois plus souvent que dans des cellules Wt (McEachern et Iyer, 2001). De façon similaire à *S.cerevisiae*, des survivants sont retrouvés de façon dépendante de *RAD52* dans les cultures sénescents de levures *K.lactis* sans télomérase (McEachern et Blackburn, 1996). Cependant, aucun survivant ne démontre des amplifications des régions sous-télomériques comme les survivants de type I chez *S.cerevisiae*. Ces survivants ont plutôt des répétitions télomériques allongées de longueurs variables similaires aux survivants de type II (McEachern et Blackburn, 1996). Ceci est probablement dû au fait que la levure *K.lactis* ne possède pas de régions sous-télomériques répétées en tandem séparées par des séquences télomériques. De plus, les télomères des survivants chez *K.lactis* ne sont pas maintenus de façon stable lors des divisions cellulaires subséquentes (McEachern et Blackburn, 1996). L'introduction de plasmides contenant un marqueur dans des séquences télomériques a permis de démontrer que les survivants chez *K.lactis* peuvent maintenir leurs télomères en utilisant de l'ADN extra-chromosomique circulaire (Natarajan et McEachern, 2002; Natarajan et al., 2003). Ainsi, le modèle de maintien des télomères par la méthode de réplication en cercle roulant est le mécanisme potentiellement impliqué pour les survivants sans télomérase chez la

levure *K.lactis*. Chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, un faible pourcentage des cellules peuvent également survivre en absence de la télomérase après la sénescence cellulaire (Nakamura et al., 1998). La majorité des survivants retrouvés possèdent leurs trois chromosomes sous forme circulaire sans aucune répétition télomérique (Nakamura et al., 1998). Une très faible proportion des survivants ont des chromosomes linéaires contenant une amplification élevée des régions sous-télomériques, probablement due à des événements de recombinaison (Nakamura et al., 1998). Ainsi, le mode de survie en absence de la télomérase chez *S.pombe* diffère quelque peu des autres levures étudiées, probablement à cause de la présence d'un petit nombre de chromosomes chez la levure de fission comparé aux autres levures.

L'ALLONGEMENT DES TÉLOMÈRES SANS TÉLOMÉrase CHEZ L'HUMAIN

Dans la majorité des cellules humaines, la télomérase est absente et des séquences d'ADN télomériques sont perdues lors des divisions cellulaires (Harley et al., 1990). Par contre, des évidences suggèrent que la télomérase serait présente dans certaines cellules normales mais à un faible niveau d'expression (Masutomi et al., 2003). Dans la variété des types de cancers chez l'humain, environ 85% des cellules cancéreuses possèdent une activité positive de la télomérase (revue dans Shay et Bacchetti, 1997). Ainsi, il a été démontré que certaines tumeurs sans activité de la télomérase pourraient maintenir leurs télomères d'une façon alternative, appelées les cellules ALT («alternative lengthening of telomeres») (Bryan et al., 1997). Similairement, des cellules sans activité de la télomérase ont également été étudiées avant et après

l'immortalisation de celles-ci et elles démontrent une augmentation de la taille des télomères après leur immortalisation (Bryan et al., 1995; Rogan et al., 1995). Les cellules ALT possèdent des télomères de taille hétérogène et normalement plus longs que des cellules normales, la longueur moyenne des TRFs étant de 20 kpb et certains peuvent aller jusqu'à environ 50 kpb (revue dans Henson et al., 2002). Ces phénotypes particuliers sont similaires à ceux observés dans les survivants de type II chez *S.cerevisiae* et ceux retrouvés chez *K.lactis*. En plus d'avoir des fluctuations au niveau de leur longueur (Murnane et al., 1994; Perrem et al., 2001), les télomères des cellules ALT peuvent être maintenus par des événements de recombinaison inter-chromosomique, sans toutefois exclure la possibilité de la recombinaison intra-télomérique (Dunham et al., 2000). Les gènes impliqués dans le maintien des télomères chez les cellules ALT n'ont pas été encore investigués directement, mais certaines protéines telles Rad52p, Rad51p et le complexe MRN pourraient être importantes dans ce processus (revue dans Henson et al., 2002). En effet, les cellules ALT possèdent des structures nucléaires particulières appelées APB («ALT-associated PML bodies»). Ces structures se distinguent par la présence d'ADN télomérique, de protéines télomériques telles TRF1 et TRF2 et des protéines impliquées dans des processus de recombinaison et de réplication (revue dans Henson et al., 2002). De plus, des molécules linéaires extra-chromosomiques d'ADN télomérique ont été retrouvées dans les APBs des cellules ALT, suggérant la possibilité que ces molécules agissent comme substrat pour l'allongement des télomères (Ogino et al., 1998; Tokutake et al., 1998; Yeager et al., 1999). La présence de cercles d'ADN extra-chromosomiques contenant des séquences télomériques a

également été détectée dans quelques lignées cellulaires humaines, de rongeurs et cancéreuses (Cohen et al., 1997; Regev et al., 1998). Tout récemment, les groupes de Griffith et de de Lange ont clairement démontré que des cellules ALT possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques contenant des répétitions télomériques (Cesare et Griffith, 2004; Wang et al., 2004). Ainsi, ces données suggèrent que les télomères pourraient être maintenus par des mécanismes de recombinaison impliquant des molécules d'ADN extra-chromosomiques. Dans le même ordre d'idée, des nanocercles télomériques de 54 nt d'ADN sb contenant des répétitions télomériques humaines peuvent servir de matrice pour réaliser la synthèse d'ADN par méthode de cercle roulant *in vitro* (Lindstrom et al., 2002). Contrairement à la situation observée chez la levure *S.cerevisiae*, des résultats contradictoires ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer que la présence de la télomérase peut inhiber le ou les mécanismes de maintien des télomères par recombinaison dans les cellules ALT (Cerone et al., 2001; Ford et al., 2001; Grobelny et al., 2001; Perrem et al., 2001).

La connexion entre les télomères et les cassures d'ADN db

Les télomères et les cassures d'ADN db partagent la même particularité : ils sont physiquement des extrémités d'ADN des chromosomes. Contrairement aux cassures d'ADN, les télomères ne doivent pas activer les «checkpoints» responsables des dommages dans l'ADN et causer un arrêt dans le cycle cellulaire (Sandell et Zakian, 1993; Karlseder et al., 1999). Les télomères sont en effet protégés des événements de recombinaison non-homologue (NHEJ) qui provoqueraient la fusion avec d'autres télomères ou avec des bris d'ADN aléatoires. La fusion de télomères entre deux

chromosomes provoquerait une grave instabilité génétique via la formation d'un chromosome dicentrique instable lors des divisions cellulaires subséquentes. Dans les deux types de fins d'ADN, les extrémités d'ADN en 5' peuvent être dégradées afin de générer des extensions 3' sb. Par contre, le processus de dégradation semble être mieux contrôlé et limité dans le cas des télomères comparativement aux cassures d'ADN db, probablement à cause de la présence des protéines liant l'ADN télomérique. De plus, les télomères possèdent des séquences d'ADN bien spécifiques à l'espèce, alors que les séquences d'ADN retrouvées lorsqu'il y a des cassures sont plutôt aléatoires. Malgré leur situation différente, les télomères et les cassures d'ADN db semblent partager certaines protéines impliquées dans les processus de recombinaison.

Un des candidats pour ce partage est l'hétérodimère Ku qui est hautement conservé entre les espèces et qui se lie avec haute affinité aux extrémités d'ADN db d'une façon indépendante des séquences et des structures (revue dans Fisher et Zakian, 2005). Cet hétérodimère est formé des sous-unités de 70 et 80 kilodaltons, appelées Ku70 et Ku80 respectivement. Il est impliqué dans le NHEJ lors de la réparation de cassures d'ADN db chez la levure et les humains, alors que paradoxalement, ce mécanisme doit être inhibé au niveau des télomères. La structure cristalline de Ku lié à de l'ADN db a révélé la présence d'anneaux dans les sous-unités qui créent une cavité centrale dans le complexe (Walker et al., 2001). L'ADN db ne peut être qu'inséré dans cette cavité, supportant le fait que Ku ne se lie qu'à des extrémités d'ADN libres. Le contact entre Ku et l'ADN ne se fait qu'avec le squelette sucre-

phosphate de l'ADN, ce qui précise son mode de liaison séquence-indépendante (Walker et al., 2001). Des résultats *in vitro* suggèrent que l'hétérodimère Ku pourrait protéger les extrémités d'ADN de la dégradation éventuelle par des exonucléases (Gottlieb et Jackson, 1993). Par contre, les études de l'implication de Ku dans la recombinaison V(D)J des immunoglobulines ont permis de démontrer que des intermédiaires de recombinaison sont stables en absence du complexe, suggérant que le rôle de protection du complexe n'est pas essentiel, du moins lors des recombinaisons V(D)J (Han et al., 1997). Chez la levure, des évidences permettent d'indiquer que le complexe Ku aurait aussi un rôle à jouer au niveau des télomères. Des souches mutantes dans le gène *YKU70* et/ou *YKU80* possèdent de très courts télomères (environ 100 pb) comparativement à ceux des cellules Wt (Boulton et Jackson, 1996; Porter et al., 1996). Ce phénotype télomérique ne semble pas être un effet indirect de la perte de fonction du NHEJ puisque la délétion du gène *LIG4*, gène qui encode une protéine homologue à l'ADN ligase IV requise pour le NHEJ, n'a aucun effet sur la longueur des télomères (Teo et Jackson, 1997). De plus, un criblage par méthode de double-hybride a permis d'identifier Sir4p comme étant un facteur qui interagit avec la sous-unité yKu70p (Tsukamoto et al., 1997). En lien avec cette interaction, des mutations affectant le complexe yKu abolissent le TPE dans les cellules, suggérant que le complexe yKu aurait une implication dans la formation de l'hétérochromatine télomérique chez la levure comme le complexe Sir2p/Sir3p/Sir4p (Boulton et Jackson, 1998). De même, des mutations dans les gènes *SIR2*, *SIR3* et *SIR4* mènent à une inefficacité de réparer des cassures d'ADN db par NHEJ dans la cellule, proposant un possible rôle du complexe Sir dans le processus de réparation

par NHEJ (Tsukamoto et al., 1997; Boulton et Jackson, 1998). Ces données proposent donc une relation entre les processus de réparation d'ADN par NHEJ et les télomères. Malgré le fait que les télomères doivent être protégés des événements de fusions par des mécanismes de NHEJ, ces extrémités des chromosomes demeurent en principe d'excellents sites de liaison pour le complexe Ku dans la cellule.

Objectifs du projet

Comme mentionné précédemment, les télomères de la levure *Saccharomyces cerevisiae* acquièrent de longues extensions 3' télomériques à la fin de la phase S. Par contre, la présence d'extensions 3' G-riches pour le reste du cycle cellulaire demeurait encore inconnue. De plus, certaines évidences suggèrent la présence d'une activité nucléase nécessaire à la création des extensions sb télomériques aux deux extrémités des chromosomes. Une régulation précise des activités de dégradation du brin C-riche télomérique devrait cependant faire intervenir certaines protéines télomériques. La caractérisation et l'analyse de la structure terminale des chromosomes de certaines souches mutantes de la levure *S.cerevisiae* ont permis de répondre en partie à ces questions encore inconnues dans le domaine :

- 1) Quels sont les facteurs cellulaires impliqués dans la protection des télomères ?
- 2) Quelle est la structure terminale des chromosomes chez la levure ?
- 3) Quelles sont les protéines impliquées dans la création des extensions 3' sb télomériques ?
- 4) Quels sont les mécanismes de recombinaison qui permettent de maintenir les télomères dans les souches de levure sans télomérase ?
- 5) Est-ce que le mode de protection conventionnelle des télomères est essentiel pour le maintien alternatif des télomères ?

ARTICLE I

Gravel, S., M. Larrivée, P. Labrecque et R.J. Wellinger. 1998. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**, 741-744.

Préambule

Ce manuscrit rapporte la présence du complexe yKu aux télomères de levure. En effet, nous démontrons par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que le complexe yKu est associé aux télomères de levure. En l'absence du complexe yKu, les télomères possèdent de longues extensions 3' du brin G-riche tout le long du cycle cellulaire, suggérant que le complexe yKu aurait un rôle de protection des séquences télomériques contre la dégradation. Finalement, nous rapportons que l'absence de yKu70 et/ou yKu80 avec les composantes de la télomérase provoque un phénotype de létalité synthétique chez la levure. J'ai contribué à environ 40% de ce travail et j'ai réalisé les figures 1B, 2A, 2B et 4 (en haut).

Yeast Ku as a Regulator of Chromosomal DNA End-Structure

Serge Gravel, Michel Larrivée, Pascale Labrecque,
Raymund J. Wellinger*

Département de Microbiologie et Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de
Sherbrooke, 3001 12th Ave Nord, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada

* To whom correspondence should be addressed. E-Mail:
R.Wellin@courrier.usherb.ca

ABSTRACT.

During telomere replication in yeast, chromosome ends acquire an S-phase specific overhang of the G-rich strand. Here it is shown that in cells lacking Ku, a heterodimeric protein involved in non-homologous DNA end-joining, such long overhangs are present throughout the cell cycle. In vivo crosslinking experiments demonstrated that Ku is bound to telomeric DNA. These results show that Ku plays a direct role in establishing a normal DNA end-structure on yeast chromosomes, conceivably by functioning as a terminus-binding factor. Since Ku-mediated DNA end-joining involving telomeres would result in chromosome instability, our data also suggest that Ku functions in a distinct mechanism when bound to telomeres.

The Ku-protein, comprising two subunits of approximately 70 and 85 kD, appears to be present in all eukaryotic cells suggesting that it is involved in a conserved and important function. Originally identified as an autoimmune antigen localized to the nucleus, this protein together with a third component, the catalytic subunit of a DNA-dependent protein kinase (DNA-PK_{cs}), is now known to be critical for non-homologous DNA double-strand break repair and the site-specific recombination of the V(D)J gene segments (1). In vitro, mammalian Ku binds directly to double-stranded (ds) DNA ends in a sequence-independent fashion (2). Thus, it has been postulated that Ku associates with ds DNA ends produced by DNA damage or during recombination and may recruit additional factors necessary for successful end-joining (1).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two genes, *HDF1* and *YKU80/HDF2* (hereafter referred to as *YKU80*), which are homologs of the two mammalian Ku-subunits (3-5). Like its mammalian counterpart, yeast Ku binds DNA ends only in the heterodimeric form (5). Consistent with the proposed roles for Ku in mammalian cells, yeast cells lacking Ku activity are severely impaired in Rad52-independent nonhomologous DNA end-joining (NHEJ) (4-6). Furthermore, yeast strains devoid of Ku do not grow at elevated temperatures (3, 4) and harbor dramatically shortened telomeres (4, 7). Recently, Hdf1p has been shown to interact with Sir4p in vivo (8). Since Sir4p is a necessary component for transcriptional silencing at several genomic loci, including telomeres, a role for Ku in telomere maintenance has been hypothesized.

The telomeres of virtually all eukaryotic chromosomes are comprised of simple direct repeats. Yeast telomeres consist of 250 to 400 bp of $TG_{2-3}(TG)_{1-6}$ repeats (commonly abbreviated TG_{1-3} or $C_{1-3}A$), and the G-rich strand forms the 3'-end of the chromosomes (9, 10). During replication of yeast telomeres, chromosomal ends acquire a transient, single-stranded (ss) extension of the G-rich strand that can be detected in native DNA with telomeric probes (11, 12). In addition, these S-phase-specific overhangs can be detected in cells without telomerase, suggesting that they can be generated and processed by other enzymes (12, 13). Because virtually no overhangs can be detected by hybridization in yeast cells not in S-phase (Fig. 1A, lane 1) (11, 12), the terminal DNA configuration in such cells could be blunt or consist of a short overhang (<20 bases) of either strand.

We reasoned that cells lacking the ability to reform a normal terminal DNA structure would arrest in late-S/G2 due to an abnormal end-structure that might be recognized by DNA damage checkpoints. Thus, a bank of randomly mutagenized and temperature-sensitive (ts) yeast strains was screened for those that arrested in G2/M at the restrictive temperature and then analyzed for their terminal DNA-structure by in-gel hybridization to native DNA (12). Analysis of an outcrossed strain (RWY737d) that carries a previously uncharacterized mutation is shown in Fig. 1A (lanes 9 and 10) (14). In addition to the strong telomeric signals for ss G-strands observed in native gels, the overall length of the telomeric repeats was reduced by about 200 bp in this strain (Fig. 1A, bottom, compare lanes 1 and 9).

Three lines of evidence indicate that the mutation in strain RWY737d resides in the *YKU80* gene. First, strains carrying a deletion of the *YKU80* gene did not complement the ts, telomeric length, or DNA end-structure phenotypes, whereas strains carrying a deletion of *HDF1* did complement (15). Second, a plasmid expressing a Myc-epitope-tagged Yku80 protein complemented all of these phenotypes (16). Third, the phenotype of a strain carrying a deletion in *YKU80* was indistinguishable from that of strains carrying the mutation identified here when assayed for telomeric repeat length and ss extensions of the G-rich strand (Fig. 1A, lanes 5 and 6). In addition, strains carrying a deletion of the *HDF1* gene or strains with a deletion of both *HDF1* and *YKU80* genes also displayed the same phenotypes (Fig. 1A, lanes 3, 4, 7 and 8). Digestion of the genomic DNA with *Escherichia coli* exonuclease I, a 3'-specific ss DNA exonuclease (12, 17), eliminated all signals in the native gels (Fig. 1A, top), reduced the hybridization intensity of the terminal restriction fragments after denaturation (Fig. 1A, bottom), and slightly reduced the size of these fragments. Using a variety of restriction enzymes and longer gels, we were able to estimate that the overhangs are ~ 50 to 90 bases in length (18). Thus, the telomeric signals observed for Ku⁻ cells in native gels correspond to unusually long terminal extensions of the G-rich strand.

For at least some end-joining reactions in mammalian cells, an association of the Ku with DNA-PK_{cs} is required (1). Yeast encodes a number of genes such as *TEL1* and *MEC1* that share some sequence homologies with the gene for DNA-PK_{cs} (19). Most notably, yeast strains with a deletion of *TEL1* also display shortened

telomeres (Fig. 1A, bottom, lane 11; Fig. 1B, bottom, lanes 5 and 6) (20). However, the terminal DNA in yeast strains with a deletion of *TEL1* had no detectable overhangs (Fig. 1A, top, lanes 11 and 12; Fig. 1B, top, lanes 5 and 6). In addition, strains with a mutation in both *YKU80* and *TEL1* had even shorter telomeric TG₁₋₃ tracts than either single mutant and displayed ss extensions (Fig. 1B, lanes 7 and 8) (7). Thus, the altered DNA end-structure observed for strains with mutations in one of the Ku genes is not simply a consequence of a short telomeric repeat tract but a specific phenotype associated with the lack of Ku. Consistent with this conclusion, the signals for ss G-rich extensions were equally visible whether Ku⁻-cells were grown at permissive or restrictive temperatures (Fig. 1B, top, lanes 3 and 4). These results also support the notion that Ku and Tel1p affect telomere length through different genetic pathways (7).

It was formally possible that a fraction of the Ku⁻-cell population would delay in late S-phase and therefore have telomeres with long overhangs, but for the rest of the cell cycle have normal terminal DNA structures (21). To investigate this possibility, we induced *yku80* mutant cells to arrest in G₁, early-S or M phases, and then assayed for G-strand overhangs (Fig. 2). Although wild-type strains did not have ss G-strands at the telomeres at any of the arrest points, the arrested *yku80* mutant cells always yielded signals that were indistinguishable from those obtained with nonsynchronized mutant cells (Figs. 2A, C). Thus, while the telomeres in wild-type cells acquire G-strand extensions only transiently in late S-phase, the telomeres in Ku⁻-cells have such overhangs throughout the cell cycle.

To determine whether yeast Ku modulates DNA end-structures by binding to chromosomal ends, we performed in vivo crosslinking studies. A *yku80* mutant strain was transformed with a plasmid encoding a Myc-epitope-tagged Yku80p and protein-DNA crosslinks were induced in vivo (Fig. 3) (22). After immunoprecipitation of whole cell extracts with the Myc-specific antibody, DNA from the pellets and supernatants was analyzed by Southern blotting. DNA fragments containing telomeric repeats were recovered in immunoprecipitates from the strain harboring the pKU80-myc plasmid (Fig. 3A, lanes 5 and 6), but not from strains lacking Yku80p (Fig. 3A, lane 1). These DNA fragments were not immunoprecipitated in the absence of antibody (Fig. 3A, lane 2) or in the absence of formaldehyde-induced crosslinking (Fig. 3A, lanes 3 and 4). Finally, when a probe specific for the yeast ribosomal DNA repeat was used on the same blot, no signal above background was detectable after immunoprecipitation (18).

To verify that the fragments immunoprecipitated were due to in vivo crosslinks and not associations occurring during extract preparation, we added a five-fold excess of a linearized plasmid to the cells prior to extract preparation (23). Fragments containing telomeric DNA were immunoprecipitated as efficiently as in the absence of competitor DNA (compare lanes 5 and 6, Fig. 3A), but virtually no competitor DNA was recovered in the pellet (Fig. 4B). These results demonstrate that yeast Yku80p can be crosslinked in vivo to chromosomal DNA comprised of telomeric repeats. The exact binding site for Ku on the telomeres is unknown, but the in vitro properties of Ku and the altered terminal DNA structure in *Ku⁻* cells strongly

suggest that Ku binds at or near the most distal telomeric repeats on yeast chromosomes.

These results show that yeast Ku is involved in establishing the proper terminal DNA structure on yeast chromosomes and that this effect is likely mediated by the direct binding of Ku at or near the chromosome ends. We have also observed a dramatic alteration in the transcriptional repression of *URA3*, a gene required for uracil biosynthesis, when this gene is located near a telomere in Ku⁻-cells (24); a result that reinforces the conclusion that Ku is present in normal telomeric chromatin.

Surprisingly, Ku⁻-cells are viable at the permissive temperature although they have an altered terminal DNA-structure. However, yeast cells harboring both a deletion of the *TLC1* gene, encoding the RNA component of telomerase (25), and a *yku80* mutation die after only ~ 10 generations (Fig. 4). Similar results were obtained when the *cdc13-2^{est}* mutation that affects telomerase function in vivo (26), was combined with a *yku80* mutation (Fig. 4). These results show that defects in components associated with the yeast telomerase are deleterious in strains that do not maintain a normal terminal DNA end-structure. It is therefore possible that in rapidly dividing cells grown at elevated temperatures, Ku-mediated establishment of a proper terminal DNA-structure would be required for maintaining a functional block of telomeric repeats via telomerase, whereas in cells grown at 23°C, normal telomerase activity and/or alternative recruitment of telomerase by ss G-strand binding proteins would suffice. Alternatively, some aspect of the telomerase-mediated maintenance of telomeric repeats could be inherently sensitive to elevated temperatures.

Whereas Ku is known to be involved in DNA end-joining activities (*1, 5, 6*), we show here that this protein also binds to chromosome ends, affects the terminal DNA configuration and is required in the absence of a functional telomerase. However, telomere to telomere end-joining reactions would lead to dicentric chromosomes and genomic instability. Therefore, the presence of Ku at yeast telomeres was surprising and suggests that this protein is involved in at least two distinct mechanisms, depending on the location of its binding. We speculate that interactions of Ku with telomerase-associated proteins or with proteins involved in NHEJ may play a crucial role in distinguishing chromosome ends, where end-to-end fusions are not desirable, from ds DNA breaks within a chromosome. Since the predominant double-stranded break repair mechanism in mammalian cells is NHEJ and since telomeres in these cells are maintained by telomerase, it will be interesting to investigate the roles of Ku in telomere maintenance in such systems.

REFERENCES AND NOTES

1. D. B. Roth, T. Lindahl, M. Gellert, *Curr. Biol.* **5**, 496 (1995); D. T. Weaver, *Trends Genet.* **11**, 388 (1995); M. R. Lieber, U. Grawunder, X. Wu, M. Yaneva, *Curr. Opin. Genet. Devel.* **7**, 99 (1997); S. P. Jackson and P. A. Jeggo, *Trends Biochem. Sci.* **20**, 412 (1995).
2. T. Mimori and J. A. Hardin, *J. Biol. Chem.* **261**, 10375 (1986); S. Paillard and F. Strauss, *Nucleic Acids Res.* **19**, 5619 (1991).
3. H. Feldmann and E.-L. Winnacker, *J. Biol. Chem.* **268**, 12895 (1993); H. Feldmann et al., *J. Biol. Chem.* **271**, 27765 (1996).
4. S. J. Boulton and S. P. Jackson, *Nucleic Acids Res.* **24**, 4639 (1996).
5. G. T. Milne, S. Jin, K. B. Shannon, D. T. Weaver, *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4189 (1996).
6. G. J. Mages, H. M. Feldmann, E.-L. Winnacker, *J. Biol. Chem.* **271**, 7910 (1996); W. Siede, A. A. Friedl, I. Dianova, F. Eckardt-Schupp, E. C. Friedberg, *Genetics* **142**, 91 (1996); Y. Tsukamoto, J. Kato, H. Ikeda, *Nucleic Acids Res.* **24**, 2067 (1996); S. J. Boulton and S. P. Jackson, *EMBO J.* **15**, 5093 (1996).
7. S. E. Porter, P. W. Greenwell, K. B. Ritchie, T. D. Petes, *Nucleic Acids Res.* **24**, 582 (1996).
8. Y. Tsukamoto, J. Kato, H. Ikeda, *Nature* **388**, 900 (1997).
9. J. Shampay, J. W. Szostak, E. H. Blackburn, *Nature* **310**, 154 (1984).
10. E. H. Blackburn and C. W. Greider, Eds., *Telomeres* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., ed. 1, 1995); C. W. Greider, *Annu.*

Rev. Biochem. **65**, 337 (1996); V. A. Zakian, *Annu. Rev. Genet.* **30**, 141 (1996);
R. J. Wellinger and D. Sen, *Eur. J. Cancer* **33**, 735 (1997).

11. R. J. Wellinger, A. J. Wolf, V. A. Zakian, *Cell* **72**, 51 (1993).
12. I. Dionne and R. J. Wellinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13902 (1996).
13. R. J. Wellinger, K. Ethier, P. Labrecque, V. A. Zakian, *Cell* **85**, 423 (1996).
14. The Hartwell collection of temperature-sensitive (ts) yeast strains (27) was analyzed for DNA content and strains that arrested with a 2n content were selected for further study. Strains H742 consistently yielded strong telomeric signals in native gels, indicative of abnormally long G-strand extensions. After three successive backcrosses, the ts phenotype associated with strain H742 segregated 2:2 in 13 of 14 tetrads analyzed. Four of these tetrads were analyzed for telomere length and DNA end-structure. In all four, short telomeres and an overhang of the G-rich strand cosegregated with the ts phenotype. As for wild type strains, ss C-strands were never detectable (18). The original designation of the mutation in these strains was *get1-1* (for G-strand extensions at telomeres), but once it was realized that *GET1* was allelic to *YKU80/HDF2* (see below), this designation was changed to conform to the currently used gene nomenclature. The precise nature of the *get1-1* mutation is unknown, but since strains harboring this mutation and strains harboring a deletion of the *YKU80* gene display identical phenotypes in all assays used here, we assume that the *get1-1* allele produces a non-functional Yku80p. Individual segregants after the outcrossing and used in this study were:

RWY738d (*MATa*, (*GET1*)*YKU80*), RWY737d, and RWY738a (*MATa*, (*get1-1*)*yku80*) and RWY739b (*MATa*, (*get1-1*)*yku80*).

15. Strains RWY737d or RWY739b (14) were crossed to strains DWY290, DWY291, DWY292 and DWY293 (28) and the indicated phenotypes were tested in diploids (18).
16. The *YKU80* gene encoding a COOH-terminal Myc-tag was obtained from genomic DNA by polymerase chain reactions (PCR). This gene contained nucleotides -638 to +1885 with respect to the first ATG of the genomic *YKU80* sequence and 33 nucleotides encoding the 10 amino acids for the Myc-tag plus a stop codon at the 3'-end. The protein thus was a full-length, wild-type Yku80p fused to the Myc-epitope recognized by the 9E10 monoclonal antibody (Boehringer Mannheim). A 2.5 kb Hind III-Not I fragment containing this gene was then subcloned into the yeast shuttle vector pRS316 (29), yielding pKU80-myc. This plasmid, when introduced into strain RWY737d ((*get1-1*)*yku80*), fully complemented the ts, telomeric length, and DNA end-structure phenotypes (18) and was also used in the immunoprecipitation studies (Fig. 3). A similar construct has been shown to complement DNA repair deficiencies in *yku80Δ* strains and the tagged protein was also fully functional in end-binding assays with yeast extracts (5).
17. I. R. Lehmann and A. L. Nussbaum, *J. Biol. Chem.* **239**, 2628 (1964).
18. S. Gravel, M. Larrivée, R.J. Wellinger; unpublished data.
19. V. A. Zakian, *Cell* **82**, 685 (1995).

20. A. J. Lustig and T. D. Petes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1398 (1986).
21. G. Barnes and D. Rio, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 867 (1997).
22. S. Strahl-Bolsinger, A. Hecht, K. Luo, M. Grunstein, *Genes Dev.* **11**, 83 (1997);
V. Orlando and R. Paro, *Cell* **75**, 1187 (1993).
23. The competitor DNA was a pVZ1 plasmid containing about 280 bp of telomeric repeats derived from plasmid pYLPV (11). This plasmid was digested with Not I to yield a linear DNA fragment of 3.5 kb and which had a block of 280 bp of telomeric repeats close to one of the ends. pVZ1 is a 3.2-kb bacterial vector derived from pBS+ (Stratagene).
24. Repression of the *URA3* gene at telomere VII-L and at *HML*, an internal chromosomal locus normally containing a repressed copy of the α mating type information, was assessed as in (25). When *URA3* is located proximal to a telomere, only 0.1 to 1% of the cells grow on media lacking uracil (25). However, in the absence of Ku, ~ 90% of the cells form colonies on such plates. In contrast, when *URA3* is located at *HML*, transcriptional repression is about equal in wild-type and Ku⁻-cells (18).
25. M. S. Singer and D. E. Gottschling, *Science* **266**, 404 (1994).
26. C. I. Nugent, T. R. Hughes, N. F. Lue, V. Lundblad, *Science* **274**, 249 (1996).
27. L. H. Hartwell, *J. Bacteriol.* **93**, 1662 (1967).
28. Strains DWY290 (*hdf1Δ::TRP1, YKU80*), DWY291 (*HDF1, YKU80*), DWY292 (*HDF1, yku80Δ::URA3*) and DWY293 (*hdf1Δ::TRP1*,

yku80Δ::URA3) were from D. Weaver (5). Strain KWR Y100 (*MAT α* , *tel1Δ::HIS3*) harbors a complete deletion of the TEL1 coding sequence and was from K. Runge.

29. R. S. Sikorski and P. Hieter, *Genetics* **122**, 19 (1989).
30. Diploids R WY80 and R WY85 were obtained by mating strain R WY739b (*MAT α* , *yku80*, *CDC13*, *TLCl*) (14) with a strain that contained the *cdc13-2^{est}* mutation (26), or with a *tlc1Δ* strain (25).
31. We thank M. Winey for analyzing and providing us with the ts mutant strains; D. Weaver, K. Runge, V. Lundblad, and D. Gottschling for supplying yeast strains; K. Runge for insightful suggestions; B. Chabot and K. Runge for input on the manuscript; and V. Lundblad for sharing unpublished data. Supported by grants from the Canadian MRC (MT-12616) and the National Cancer Institute of Canada (#007103). R.J W is a Chercheur-Boursier Senior of the FRSQ.

FIGURE LEGENDS.

Fig. 1. Altered telomeric end-structure caused by mutations in yeast Ku genes. **(A)**

Top: DNA from strains with the indicated genotypes and grown at 23°C was mock treated (lanes 1, 3, 5, 7, 9, and 11) or digested with *E.coli* exonuclease I (lanes 2, 4, 6, 8, 10, and 12). All samples were then digested with Xho I and analyzed by nondenaturing in-gel hybridization using a 22-mer oligonucleotide probe comprised of telomeric C₁₋₃A repeats (12). About two thirds of the terminal restriction fragments are of a size indicated by the bar. The additional bands seen derive from individual telomeres lacking a subtelomeric repeated element Y'. The lanes marked ss and ds contain DNA with telomeric TG₁₋₃ repeats in single-stranded and double-stranded form respectively. M: end-labeled 1 kb ladder DNA (Gibco-BRL) serving as size standard. The bottom panel shows the same gel after denaturation of the DNA and rehybridization with the same telomeric probe. Strains used were: DWY291 (lanes 1, 2), DWY290 (lanes 3, 4), DWY292 (lanes 5, 6), DWY293 (lanes 7, 8), RWY737d (lanes 9, 10), KWRVY100 (lanes 11, 12)(28). **(B)** A diploid yeast strain formed with haploids KWRVY100 (*tel1Δ::HIS3, YKU80*) and RWY739b (*TEL1, yku80*) was sporulated and individual tetrads dissected. All four spores from a tetratype tetrad were grown at 23°C (lanes 1, 3, 5, and 7) or incubated at 37°C (lanes 2, 4, 6, and 8) prior to DNA isolation and analysis by non-denaturing hybridization (top), followed by denaturation of the DNA and rehybridization (bottom) as in (A).

Fig. 2. Analysis of G-strand overhangs throughout the cell cycle. **(A)** Strains RWY738a (*yku80*), RWY738d (*YKU80*) and DWY293 (*hdf1Δ::TRP1, yku80Δ::URA*) were grown to log-phase in rich media (lanes 1, 3, and 5; marked C) or arrested in G1 by incubating them with 0.75μM α-factor for 2 hours (lanes 2, 4, and 6; marked G1). DNA was isolated and analyzed for G-strand overhangs on terminal restriction fragments as in Fig. 1. **(B)** Prior to DNA isolation, part of the cultures analyzed in (A) was stained for DNA with propidium iodide and analyzed for DNA content using standard flow cytometry. X-axis indicates relative fluorescence in arbitrary units. **(C)** Strains DWY291 (*YKU80*), DWY292 (*yku80Δ::URA*) and RWY737d (*yku80*) were grown to log-phase (lanes 1, 4, and 7; marked C), arrested in early-S with 0.4 M hydroxyurea (lanes 2, 5, and 8; marked S), or arrested in M-phase with 20μg/ml nocodazole (lanes 3, 6, and 9; marked M). Flow cytometric DNA analysis showed that >90% of the cells were at the expected arrest points (18). Analysis for G-strand overhangs in these samples was as in (A). Denaturation and rehybridization of the gel with the telomeric oligo showed that all lanes contained about equal amounts of DNA (18).

Fig. 3. Immunoprecipitation of telomeric repeat DNA with an antibody specific for a tagged Yku80p after in vivo crosslinking. **(A)** Strain RWY737d (*yku80*) was transformed with pRS316 (lane 1) or with pKU80-myc (lanes 2, 3, 4, 5, and 6) (16). Protein-DNA crosslinking, preparation of whole-cell extracts, and

immunoprecipitation with the 9E10 antibody were as in (22), except that protein G agarose (Boehringer) was used instead of protein A sepharose. DNA from the pellets was deproteinized and analyzed by Southern blotting using a fragment containing 280 bp of TG₁₋₃-repeats as probe (11). The controls were as follows: lane 1: control plasmid without the YKU80-myc gene; lane 2: no antibodies added; lanes 3 and 4: no crosslinking induced. In addition, 0.2 µg of a linearized plasmid containing 280 bp of telomeric repeats (23) was added to the cells represented in lanes 4 and 6 after crosslinking (lane 6) or prior to extract preparation (lane 4). In lane 7, linearized pVZ1 DNA was loaded as control. Bar indicates the signal for telomeric repeat-containing fragments. **(B)** The blot in (A) was rehybridized to a randomly labeled pVZ1 probe. **(C)** As a control for DNA input, 4% of the DNA that remained in the supernatants and washes after the immunoprecipitation was analyzed by Southern blotting using the pVZ1 DNA probe. The heavy arrow indicates the linearized pKU80-myc. The small arrow indicates the linearized pRS316 DNA. The heavy smears below 3 kb in lanes 4 and 6 are due to the added competitor DNA.

Fig. 4. Accelerated death of cells when a *yku80* mutation is combined with mutations affecting telomerase. Top: Diploid strain RWY80 (*cdc13-2^{est}/CDC13*, *YKU80/yku80*) (30) was sporulated and individual tetrads dissected. Colonies of a single tetrad were restreaked onto rich media and incubated at 23°C (left). The cells harboring the *yku80* mutation alone did not grow at 37°C (right), but did not senesce upon five more successive restreaks at 23°C (18). Cells with the *cdc13-2^{est}* mutation were not ts

(right), but ceased to grow after two more successive restreaks (18). Cells labeled WT (wild-type) were not ts and did not show senescence. Bottom: Diploid RWY85 (*tlc1Δ/TLC1*, *YKU80/yku80*) (30) was sporulated, tetrads dissected and cell phenotypes identified as above. For both crosses, each tetrad type tetrad analyzed in this way (6/6) contained one colony from which viable cells could not be recovered and the genetic analysis of the other three colonies indicated that these dead cells were the double mutants. 1X and 2X indicate the number of times the cells were restreaked at the indicated temperatures, corresponding to ~ 30 and ~ 50 generations of growth, respectively.

Figure 1

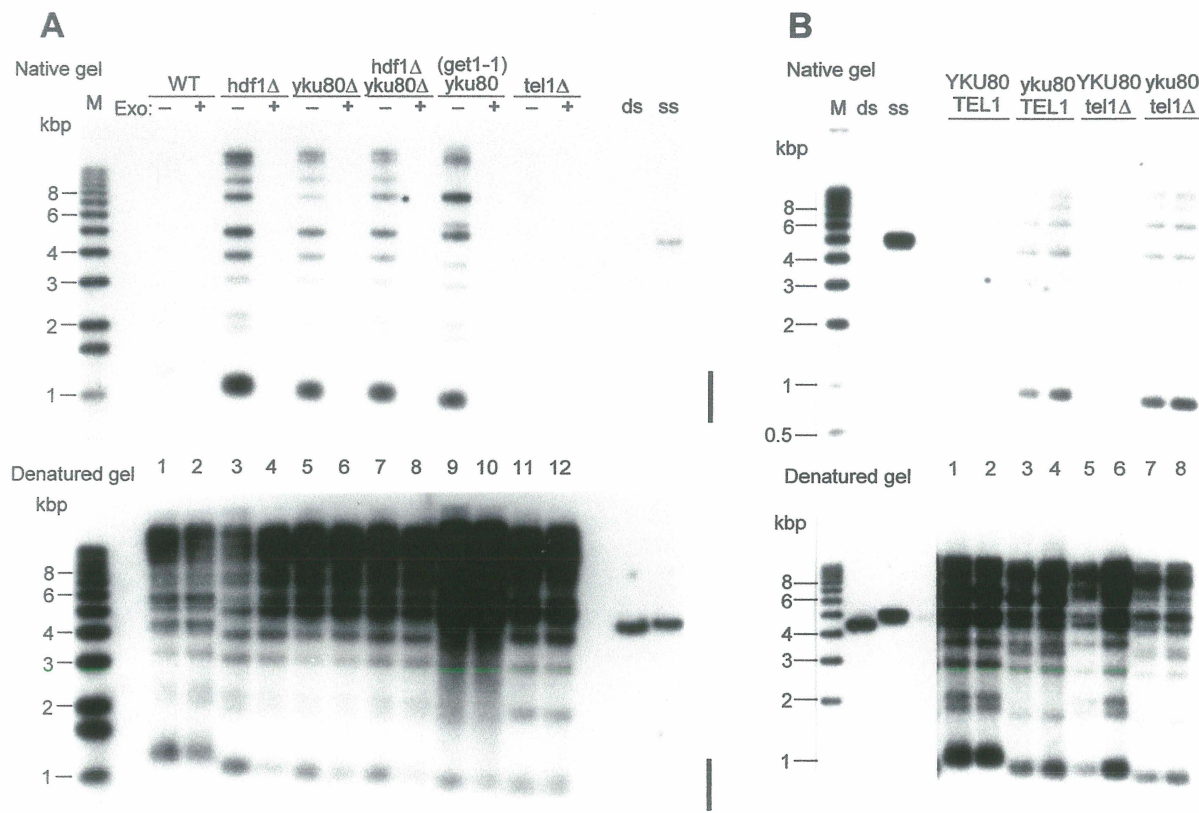


Figure 2

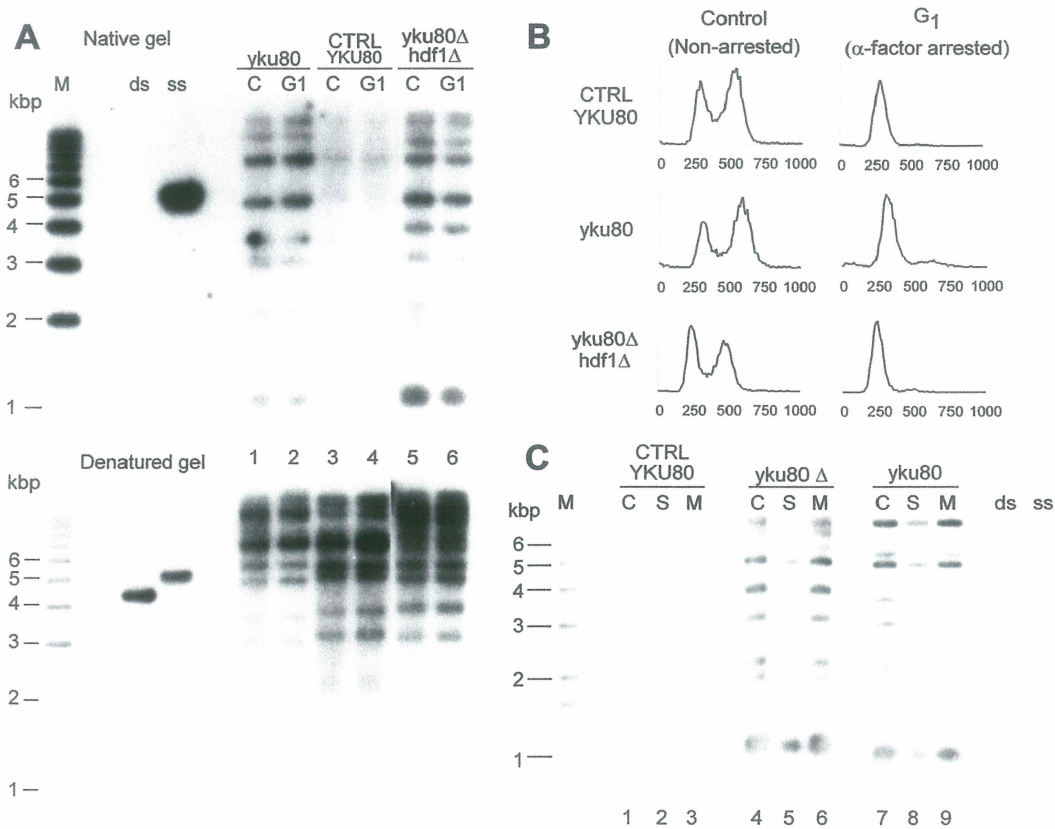


Figure 3

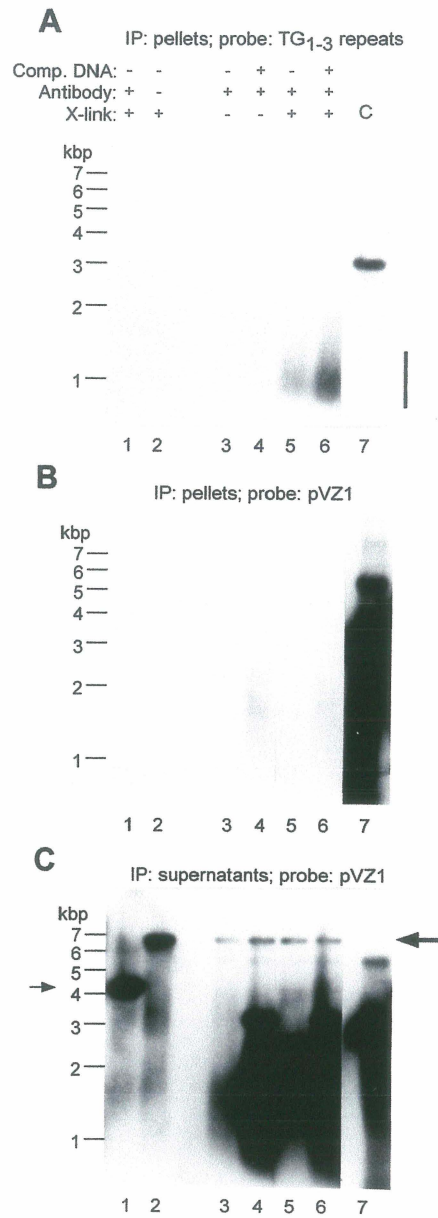
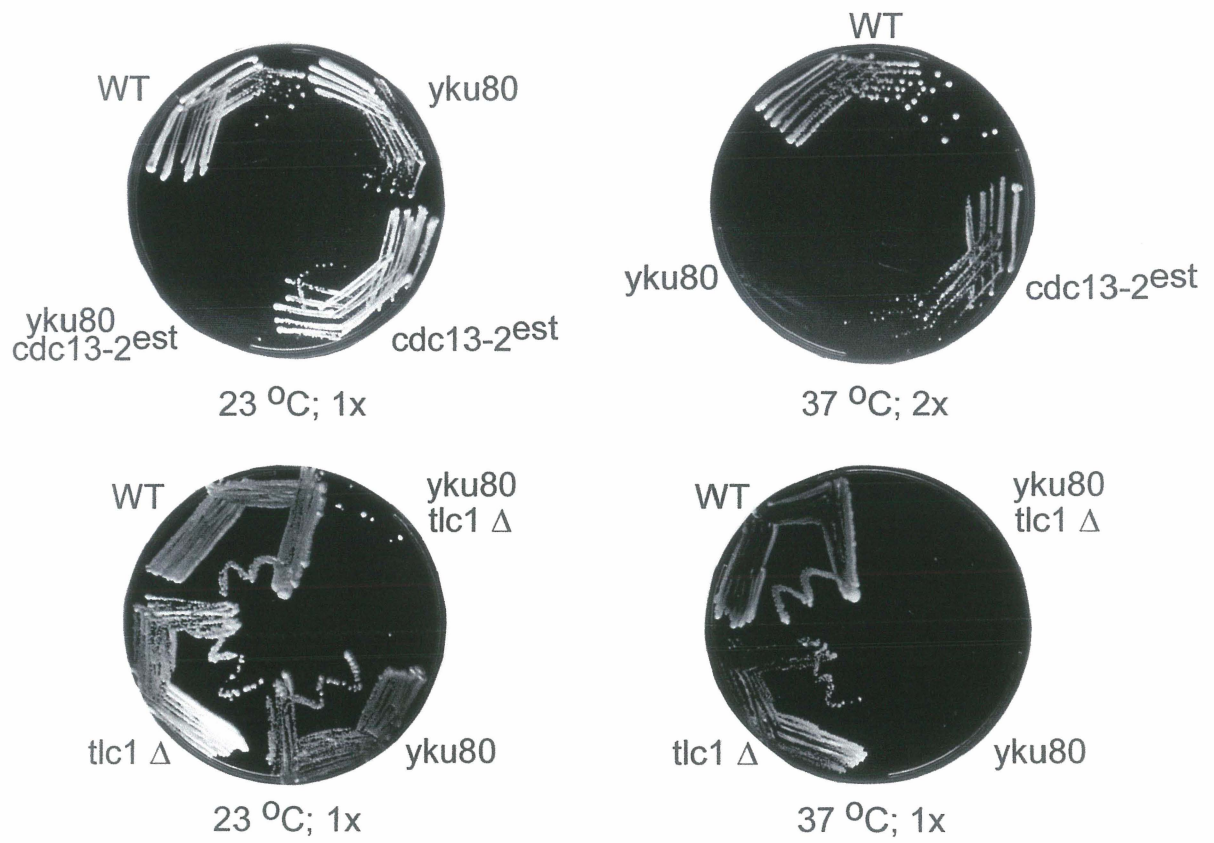


Figure 4



ARTICLE II

Larrivée, M., C. LeBel et R.J. Wellinger. 2004. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**, 1391-1396.

Préambule

Ce deuxième manuscrit démontre que la structure terminale des télomères de levure se compose d'une courte extension 3' du brin G-riche de 12 à 14 nucléotides en phase G₁. De plus, nous rapportons que le complexe Mre11/Rad50/Xrs2 (MRX) est important pour maintenir et/ou générer ces extensions. En effet, des souches mutantes pour un de ces gènes du complexe possèdent de très courtes extensions 3' télomériques tout le long du cycle cellulaire, la majorité étant au-dessous de 8 nucléotides. Puisqu'il y a encore la présence d'extensions télomériques sb, des activités nucléases redondantes semblent être impliquées dans le processus de dégradation en absence du complexe MRX. J'ai contribué à environ 70% de ce travail et j'ai réalisé les figures 1, 2, 4B, 5 et les figures supplémentaires 1 et 2. J'ai également rédigé plusieurs versions complètes du manuscrit.

**The generation of proper constitutive G-tails on yeast
telomeres is dependent on the MRX-complex.**

Michel Larrivée, Catherine LeBel and Raymund J. Wellinger *

Département de Microbiologie et Infectiologie
Groupe ARN/RNA Group, Faculté de Médecine
Université de Sherbrooke
3001 12^e Avenue Nord
Sherbrooke, J1H 5N4
Canada.

Running Title: MRX is essential for G-tails in yeast

Keywords: Telomeres, G-tails, MRX-complex, Yeast.

*Corresponding author. Phone: (819) 564-2514. Fax: (819) 564-5392. E-mail:

Raymund.Wellinger@Usherbrooke.ca

ABSTRACT

The precise DNA arrangement at chromosomal ends and the proteins involved in its maintenance are of crucial importance for genome stability. For the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, this constitutive DNA configuration has remained unknown. We demonstrate here that G-tails of 12-14 bases are present outside of S-phase on normal yeast telomeres. Furthermore, the Mre11p protein is essential for the proper establishment of this constitutive end-structure. However, the timing of extended G-tails occurring during S-phase is not affected in strains lacking Mre11p. Thus, G-tails are present on yeast chromosomes throughout the cell cycle and the MRX-complex is required for their normal establishment.

INTRODUCTION

The physical ends of eukaryotic chromosomes, the telomeres, have a very conserved structure and are essential for genome stability (reviewed in Blackburn 2001; Chakhparonian and Wellinger 2003). Short direct DNA repeats constitute the underlying telomeric DNA and the strand running 5' to 3' toward the end of the chromosomes is usually rich in guanines (the G-rich strand). Lagging-strand synthesis always occurs on this G-rich strand and will leave a short gap at the 5' end of the newly synthesized C-rich strand. This gap can not be filled in by repair and a 3' G-rich overhang, called G-tail, remains. On the other end, leading-strand synthesis is thought to produce a blunt extremity. However, studies of the terminal DNA arrangement in a variety of organisms suggest that a G-tail is a conserved motif for all telomeres (Chakhparonian and Wellinger 2003). Thus, the question arises as to how the blunt-ended DNA-ends generated by leading-strand synthesis are converted into ends with a G-tail.

Studies in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have shown that its telomeres acquire detectable G-tails late in S-phase, after conventional replication (Wellinger et al. 1993a; Wellinger et al. 1993b). Moreover, at least on the ends of a linear plasmid, G-tails occur on both, leading- and lagging-strand ends (Wellinger et al. 1996). Surprisingly, these S-phase specific G-tails can also be detected in cells lacking telomerase, the main activity responsible for replicating telomeric G-strands (Dionne and Wellinger 1996). Collectively, these results suggest that the blunt end left after completion of leading-strand synthesis is processed into an end with a G-tail, presumably by nuclease/helicase activities (Wellinger et al. 1996). Analyses of the

requirements to establish a normal telomeric DNA end-structure are hampered by the fact that for wild-type (wt) yeast cells, the precise DNA arrangement outside S-phase is unknown.

Recent studies on the Mre11p/Rad50p/Xrs2p (MRX) proteins, an evolutionarily conserved complex involved in a number of processes in mitosis and meiosis, revealed that this complex may play a key role in telomere length maintenance in humans, plants and yeasts (reviewed in Haber 1998; D'Amours and Jackson 2002). Yeast cells harbouring a deletion of any one of these genes are viable, but display shortened telomeric repeat tracts (Kironmai and Muniyappa 1997; Boulton and Jackson 1998). The Mre11p protein alone, or in association with other proteins, displays various nucleolytic activities (D'Amours and Jackson 2002), and it has been demonstrated that in a *de novo* telomere formation assay, the MRX-complex is needed for the generation of telomeric G-strand DNA and the loading of G-tail binding proteins (Diede and Gottschling 2001). In addition, the MRX-complex in *Schizosaccharomyces pombe* might process telomeric DNA ends in absence of a DNA double-stranded binding protein Taz1p (Tomita et al. 2003).

In order to gain insights into the requirements to establish a normal DNA-end at telomeres, we developed a stringently controlled hybridization assay as well as a primer-extension assay. The results demonstrate that most of normal yeast telomeres end in a G-tail of about 12-14 bases. Moreover, we show that in *mre11Δ*-strains, this constitutive DNA end-structure is compromised; specifically, G-tails in such mutant strains are shorter. In addition, while the dynamics of the cell cycle-dependent increase of G-tail signals at the end of S-phase occurs in both wt and mutant strains in

an indistinguishable fashion, signals for G-tails at the end of S-phase were also weaker in the *mre11Δ*-strain. The data thus show that short 10-15 bases G-tails are the proper ends of yeast chromosomes and in *mre11Δ* cells, there is a deficiency in forming those G-tails, even though G-tail presence is not completely abolished. Therefore, the MRX-complex does play a direct role in telomeric end-structure processing in normal yeast cells and could play a similar role at mammalian telomeres.

RESULTS AND DISCUSSION

Telomeric end-structure is affected in the absence of MRX-complex. There is accumulating evidence that the three interacting proteins Mre11p, Rad50p and Xrs2p (NBS1), forming the MRX- or MRE11-complex, play a role in telomere maintenance in yeasts, plants and mammals. If the MRX-complex were involved in the processing of the blunt ends left after completion of leading-strand synthesis at the telomeres, one would expect to detect shorter G-tails (either transiently or constitutively) on yeast telomeres in strains lacking any of the components of the complex. The presence of G-tails can be assessed using a non-denaturing in-gel hybridization technique that we developed previously (Dionne and Wellinger 1996). Such analyses on DNA derived from asynchronously grown wild-type (wt) cell cultures yielded very faint signals for chromosomal terminal restriction fragments (TRFs). It remained unclear, whether these signals were due to constitutive short G-tails or whether they were due to a fraction of cells being in late S-phase, when G-tails are easily detectable on yeast telomeres (Wellinger et al. 1993b; Dionne and Wellinger 1996). However, such signals on telomeres of a high-copy linear plasmid of 7.5 kb, called YLpFAT10, are concentrated in a small area of the gel and become readily visible, even on DNA derived from G1-arrested cultures (fig. 1A, middle; fig. 1B). FACS analysis and counting of unbudded vs. budded cells of these cultures established that the vast majority of cells ($\geq 95\%$) were indeed in G1 (data not shown, see Supplementary fig. 1). More importantly, when genomic DNA isolated from *mre11* Δ strains was analyzed in the same fashion, a significant reduction of the signals for the G-tails is observed (fig. 1A, middle panel, compare lanes marked *MRE11* with those marked

mre11Δ; fig. 1B). Treatment of the DNA with exonuclease I prior to the end-structure analyses (lanes ExoI+ in fig. 1A) indicates that the detected signal indeed corresponds to terminal single-stranded G-strands. Furthermore, the same gel shown in fig. 1A was also hybridized to a G-rich probe and no telomeric C-rich signals were detected (data not shown). Quantification of the signals for G-tails confirmed that they are about 1.3-2 fold lower on DNA derived from *mre11Δ*-cells as compared to wt cells (fig. 1B). Similar results were obtained for a *rad50Δ* strain, with strains of different genetic backgrounds and when chromosomal telomeres were analyzed (fig. 1B, supplementary fig.2, and data not shown). Collectively, these results demonstrate that in G1, G-tails can be detected on telomeres of yeast cells, and that the signal for G-tails in *mre11Δ*-cells is reduced when compared to wt cells.

We next investigated the length of the telomeric G-tails for cells in G1. As a means of comparison, constructs containing a stretch of nucleotides corresponding to telomeric repeats were used. The plasmid with the longest tract (GT22) contains 22 nucleotides that are perfectly complementary to the CA-probe used for the in-gel hybridization technique. In addition, derivatives of GT22 were obtained (GT19 to GT10). These constructs harbour stepwise shortened tracts of telomeric sequences, each being 3 nucleotides shorter than the previous one. The different plasmids generated were double-digested and heat denatured prior to loading onto a gel (lanes GT10 to GT22 in fig. 2A). Note that a fragment migrating to an apparent length of 1.1 kb of all plasmids carries a sequence complementary to T7 and M13 probes, and that the G-rich telomeric repeat tract of indicated size resides on slightly larger fragment. On the same gel, genomic DNA derived from G1-arrested wt-cells was

analyzed for G-tails (lanes WT in fig. 2A). The gel was first hybridized to an M13 probe to show about equal loading of the GTxx plasmids (fig. 2A, top left, open arrowhead). Next, the gel was hybridized to the 22-mer CA probe, revealing the fragment containing the G-rich strand of the different GT-plasmids (closed arrowheads in fig. 2A), as well as G-tails on YLpFAT10 (* in fig. 2A). An exposure was obtained after each washing step and the relative signals for all bands were quantified. By comparing the loss of signals occurring at each individual washing temperature for the known lengths of GT-tracts on the plasmid DNA to the loss of signals on YLpFAT10 telomeres, an estimation of the lengths of G-tails on YLpFAT10 could be derived (fig. 2B). Clearly, at lower washing temperatures (20°C-30°C), the signals for the telomeres on YLpFAT10 are reduced to a greater extent than the signals for even the shortest model target plasmid, GT13 (red vs black curve in fig. 2B). If the overhangs were completely complementary to the 22-mer CA probe, these results suggest that they are shorter than 13 nt. However, given that telomeric overhangs are of a variable sequence composition, it is likely that a considerable fraction of telomeres contains a number of mismatches with respect to the probe. We compared all theoretical possibilities of 16 nt overhangs to the sequence of the probe and found that all can yield at least 13 nt matches to it (data not shown). Thus, this experiment suggests that G-tails on telomeres of wt cells are shorter than 16 bases and only a minority could bear G-tails longer than that.

The above provided a rough estimate for the lengths of G-tails on a population of telomeres in wt cells, but could not yield a precise determination of G-tail lengths on individual telomeres. We therefore developed a modified primer-extension

method, in which poly-A tailed purified TRFs were annealed to an end-labelled poly-T oligonucleotides ending with a C or an A at their 3'-end (fig. 3, top). The annealing products were then extended using T4 DNA polymerase in conditions that minimized strand-displacement at the double-stranded to single-stranded transition point. In order to verify the reliability of the method, conditions were established using a model oligonucleotide substrate with a sequence composition similar to the one expected on the TRFs (DUP-16, fig. 3 left). TRFs purified from the various strains were first analyzed for telomeric DNA end-structure using non-denaturing in-gel hybridization to make sure that no alterations occurred during DNA manipulations (data not shown). Optimized conditions were then applied to such purified TRFs derived from wt and *mre11Δ*-cells (fig. 3). For wt cells, extension products up to 12 to 14 nucleotides are readily detectable. Remarkably, products of 9 to 12 nucleotides were more abundant than shorter products. In contrast, short products (+ 2 to + 8) were much more abundant than the longer products when DNA derived from *mre11Δ*-cells was used (fig. 3). However, we note that even with DNA derived from these mutant cells, weak signals for G-tails of the same length as those seen with DNA derived from wt cells could be detected. Quantification of the signals revealed that with DNA derived from wt cells, about 3-4 fold more signal is in the range of +8 and longer as compared to the *mre11Δ*-cells (data not shown, see fig. 3). Therefore, while all strains can have G-tails of 12 to 14 bases, the fraction of telomeres ending with a G-tail of 8 nt and longer is significantly reduced in *mre11Δ*-cells. At least qualitatively, these results are consistent with the results obtained using hybridization techniques (figs. 1, 2) and confirm that a large fraction of the constitutive G-tails

observed on telomeres in G1 is shorter in *mre11Δ*-cells, when compared to wt cells. Taken together, the data show that the constitutive chromosomal DNA end-structure for wt yeast cells encompasses overhangs of the G-rich strand that vary in length with most of them being shorter than 14 nucleotides. Moreover, the constitutive G-tails on telomeres of *mre11Δ*-cells clearly are shorter, most of them being shorter than 8 bases.

The majority of yeast telomeres carry constitutive overhangs. Next, we wished to examine what fraction of telomeres does carry such 3'-overhangs and whether some telomeres carried a blunt end or a short 5'-overhang. Genomic DNA with a native telomeric end-structure was treated with Exonuclease III. This strand-specific exonuclease degrades the strands with the 3'-end on dsDNA that is blunt or possesses a 5'-overhang. As positive controls, we used genomic DNA on which telomeres were blunt-ended by ExoI treatment as in fig. 1 prior to ExoIII treatment. On this DNA, the generation of 5'-overhangs is detectable by a GT-probe after non-denaturing in-gel hybridization (fig. 4A). However, native ends are by en large resistant to ExoIII treatment (fig. 4A). Quantification of the gel revealed that the signals for blunted ends were 5-10 fold increased when compared to those obtained with native telomeres. In a second and independent approach, we used YLpFAT10 telomeres to determine the amount of ends harboring G-tails. Since YLpFAT10 as well as the pGTxx plasmid series each contained one sequence element complementary to the T7-probe, the estimated number of telomeres ending with G-tails could be derived by comparing signals obtained on pGTxx plasmids with those on YLpFAT10. DNA in gels such as shown in fig. 2A was denatured, hybridized to a T7 probe and the signals for the

GT22, GT19 plasmids and YLpFAT10 were quantified. This yielded an approximate ratio of YLpFAT10 molecules with respect to the control pGTxx DNAs on the gels. In parallel, the same DNA was analyzed by non-denaturing in-gel hybridization using the CA-telomeric probe, washed at 4°C and signal intensities for plasmids GT22, GT19 and YLpFAT10 were again quantified. These latter signal intensities were corrected for the fact that each YLpFAT10 molecule contains two telomeres whereas the pGTxx plasmids only contained one target sequence for the CA-probe. The obtained values were then adjusted to the molecular ratio of the molecules. Assuming equal chances of hybridization to each of the targets, the obtained values indicate the fraction of YLpFAT10 telomeres hybridizing to the probe (fig. 4B). Although there is some variability, the data corroborate the results obtained with the ExoIII experiments in that at least 80% of the telomeres on YLpFAT10 hybridized to the probe, when the gels were washed at 4°C. Taken together, these data indicate that the vast majority and most likely all native telomeres have a 3'-overhang.

The dynamics of the cell cycle-dependent changes in G-tail detection is not affected in mre11Δ-cells. Since we observed that *mre11Δ*-cells display shorter G-tails than wt cells, we were interested to determine whether the S-phase dependent increase in G-tail signals observed in wt cells was decreased or abolished in the mutants. *MRE11*- and *mre11Δ*-cells were synchronized and DNA analyzed at different time points by in-gel hybridization (suppl. figs. 1 and 2; data not shown). A quantification of the relative signals shows a significant reduction for telomeric G-tail signals in α -factor and *cdc7*-arrested *mre11*-cells when compared to wt cells (fig. 5). For the cells that were released, the relative signals for G-tails increase for both strains in S-phase (fig.

5). From these data it is clear that *mre11Δ*-cells display a cell cycle-dependent change in the G-tail signals as wt cells do. Throughout the experiment, a significant difference between G-tail signal intensity for wt and *mre11Δ* strains was observed, suggesting that not only G1-specific G-tails, but also the S-phase specific G-tails may be shorter in the mutant strain. However, due to the techniques used, such comparisons between cultures are challenging and it remains uncertain whether this constant difference is real. Nevertheless, these results are consistent with previous data, which suggested that nucleolytic processing of a DNA double-strand break generated at the *MAT* locus during mating-type switching is inefficient in strains harbouring deletions of the *RAD50* or *XRS2* genes (Ivanov et al. 1994). It is therefore tempting to speculate that the lower levels of the cell cycle-dependent G-tails observed in our synchrony experiments with *mre11Δ*-cells are due to inefficient processing. Importantly though, the data do show that in the mutant strain, S-phase dependent long G-tails are generated, suggesting that it is a processing event that probably occurs after DNA replication and which should establish a normal end-structure for the rest of the cell cycle, that is affected in these cells.

There is previous evidence that the MRX-complex could be involved in a chromosome-end processing event. For example, with respect to G-strand replication, the MRX-complex is in the same epistasis group as telomerase components (Nugent et al. 1998). Furthermore, in a telomere formation assay that is based on HO-cutting and exposing a short telomeric repeat tract, the MRX-complex was shown to be needed for Cdc13p-binding, and hence G-tail formation. In *mre11Δ*-cells, telomere formation was delayed, but not completely abolished (Diede and Gottschling 2001).

Our results reported here are consistent with that idea: *mre11Δ*-cells have an altered telomeric end-structure, consisting in shorter G-tails (figs. 1, 3). However, Cdc13p-binding to telomeres appears not to be reduced in *mre11Δ*-cells (Tsukamoto et al. 2001), which suggests that *in vivo*, the length requirements for binding of this protein to G-tails may be less than 11 bases, the minimal length required for binding *in vitro* (Hughes et al. 2000). Alternatively, there may be a different mode of Cdc13p-binding on yeast telomeres with very short overhangs. Taken together, the data suggest that in absence of the MRX-complex, alternative activities establish an altered and shortened G-tail on yeast telomeres. This also suggests that the establishment of such an end-structure and the binding of Cdc13p are essential features for telomere-capping.

These suggested roles for the MRX-complex in processing yeast telomeres may be conserved in mammals. For example, the functional homologue of the yeast Xrs2p in humans, NBS1, associates transiently with a telomeric complex of hRAD50/hMRE11/TRF2 (Zhu et al. 2000). This association occurs in S-phase of the cell cycle and it has been suggested that the association of NBS1 with hRAD50 and hMRE11 at telomeres either is necessary to prepare the telomeres for replication, or for a post-replicative processing event, such as the generation of appropriate G-tails and/or the formation of t-loops (Zhu et al. 2000). Furthermore, there is evidence for an S-phase specific regulatory role for the NBS1 protein in maintaining telomeres in the absence of telomerase in human cell lines (Wu et al. 2000). The MRX-complex is also involved in intra-S checkpoint signalling (D'Amours and Jackson 2001). On telomeres, the DNA-strand replicated by leading strand synthesis is thought to become a transiently blunt-ended molecule. Such ends may be sensed by this

checkpoint and processing to expose a single-stranded 3' end could be initiated. Therefore, our results raise the possibility that such leading-strand ends may have particular requirements for recognition and processing, which would involve the MRE11-complex in yeast and humans.

MATERIALS AND METHODS

Yeast cell growth, DNA manipulations and analyses followed standard and published protocols. For details, see the Materials and Methods section in the Supplementary Materials (webpage address).

Primer extension analysis of G-tails. 0.1 ng of the oligo DUP-16 were boiled for 10 min in PE1 buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol) and let to anneal at 23°C for more than one hour. Chromosomal terminal restriction fragments (TRFs) were gel purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Standard poly-A tailing reactions were performed with annealed DUP-16 oligo or gel purified TRFs (details to be published elsewhere). Radiolabelled poly-T+(C/A) oligo (5'-CGGAATTCC(T)₁₈M-3'; M = C or A) was annealed to these 3' terminally tailed products in PE1 buffer at 16 °C for 16 hours. Primer-extension reactions were performed on annealed substrates in PE1 buffer, which also contained 0.325 mM dATP, 0.325 mM dCTP and 20 µg BSA, at 12 °C for 20 min. In these conditions, strand displacement occurs on less than 10% of products (not shown and fig.3). Reactions were stopped and loaded on a 15% polyacrylamide gel.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P. Szankasi for yeast strains and S. Martin for help with the pGTxx plasmids. We also thank D. Gottschling for a critical reading of the manuscript, anonymous reviewers for comments and suggestions and all members of the Wellinger laboratory for many valuable discussions. This work was supported by a research grant (MOP 12616), and a core group grant (GRP86284) from the Canadian Institutes for Health Research. M.L. was supported by an MRC studentship, C.L. by a studentship of NSERC and R.J.W. is a Chercheur National of the FRSQ.

REFERENCES

- Blackburn, E.H. 2001. Switching and signaling at the telomere. *Cell* **106**: 661-73.
- Boulton, S.J. and S.P. Jackson. 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* **17**: 1819-28.
- Chakhparonian, M. and R.J. Wellinger. 2003. Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet* **19**: 439-46.
- D'Amours, D. and S.P. Jackson. 2001. The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* **15**: 2238-49.
- . 2002. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-27.
- Diede, S.J. and D.E. Gottschling. 2001. Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr Biol* **11**: 1336-40.
- Dionne, I. and R.J. Wellinger. 1996. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13902-7.
- Haber, J.E. 1998. The many interfaces of Mre11. *Cell* **95**: 583-6.
- Hughes, T.R., R.G. Weilbaecher, M. Walterscheid, and V. Lundblad. 2000. Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the

- Saccharomyces cerevisiae Cdc13 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6457-62.
- Ivanov, E.L., N. Sugawara, C.I. White, F. Fabre, and J.E. Haber. 1994. Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **14**: 3414-25.
- Kironmai, K.M. and K. Muniyappa. 1997. Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of Saccharomyces cerevisiae. *Genes Cells* **2**: 443-55.
- Nugent, C.I., G. Bosco, L.O. Ross, S.K. Evans, A.P. Salinger, J.K. Moore, J.E. Haber, and V. Lundblad. 1998. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**: 657-60.
- Tomita, K., A. Matsuura, T. Caspari, A.M. Carr, Y. Akamatsu, H. Iwasaki, K. Mizuno, K. Ohta, M. Uritani, T. Ushimaru, K. Yoshinaga, and M. Ueno. 2003. Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres. *Mol Cell Biol* **23**: 5186-97.
- Tsukamoto, Y., A.K. Taggart, and V.A. Zakian. 2001. The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of Saccharomyces cerevisiae telomeres. *Curr Biol* **11**: 1328-35.
- Wellinger, R.J., K. Ethier, P. Labrecque, and V.A. Zakian. 1996. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**: 423-33.

- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993a. Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**: 4057-65.
- . 1993b. Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51-60.
- Wu, G., W.H. Lee, and P.L. Chen. 2000. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. *J Biol Chem* **275**: 30618-22.
- Zhu, X.D., B. Kuster, M. Mann, J.H. Petrini, and T. Lange. 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**: 347-52.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. G-tail signals are reduced in *mre11Δ* strains.

A) Genomic DNA derived from α -factor arrested cells was digested with *XhoI*. G-tails on YLpFAT10 (indicated by asterisk) were analyzed by native in-gel hybridization for wt and *mre11Δ* strains (MLY50 and MLY51). DNAs were either mock-treated (labelled ExoI-), or treated with *E. coli* Exonuclease I (labelled ExoI+), before in-gel analysis. Top left panel: Ethidium-bromide stained gel; top right panel: the gel after non-denaturing hybridization to the CA-probe; bottom left panel: the DNA was denatured in the gel, transferred to a nylon membrane and the membrane hybridized to a Y'-probe. Single-stranded phagemid DNA containing yeast telomeric repeats of the G-rich strand (ssGT) and of the C-rich strand (ssCA) served as a positive and negative controls respectively. The ssGT control was mixed with *PvuI*-digested pMW55, the latter serving as double-stranded control (ds, a fragment of 1.9 kb). Linearized pVZY'K plasmid (3.9 kb) served as a positive control for the hybridization with the Y' probe (labelled Y'). M: end-labelled 1 kb ladder DNA serving as a size standard.

B) Relative amounts for G-tails (relative signals for ssDNA, in arbitrary units) were obtained by calculating the ratio of the respective signals on the native gels over the total amount of Y' TRF signals or YLpFAT10 signals. Three to six individual non-synchronous cultures were tested for each strain and the standard deviation is indicated.

Figure 2. Most G-tails on telomeres in G1-arrested cells are shorter than 16 bases.

A) The individual pGTxx plasmids, each containing telomeric repeat tracts ranging from 10 to 22 bp, were double-digested and heat denatured prior to loading on an agarose gel. A common DNA fragment serves as loading control after hybridization to an M13-probe (open arrowheads), while a fragment migrating at about 1.3 kb of each plasmid contains the TG₁₋₃ repeats of varying lengths serving to compare the hybridization of the CA-probe with different telomeric repeat lengths (closed arrowheads). Wild-type cells (MLY30 strain) were arrested in G1 with α -factor and *XhoI*-digested DNAs derived from those cells were loaded on the gel (lane marked WT). After hybridization to the M13-probe (top left), the same gel was then hybridized at 4°C to the CA-probe and washed at different temperatures as indicated at the bottom of gels shown. The signals obtained for G-tails on YLpFAT10 (indicated by asterisk) were compared to those detected on the 1.3 kb DNA fragments derived from the pGTxx plasmids after different washing temperatures. Controls and molecular size standards are as described in fig. 1.

B) Remaining signals on pGTxx fragments as well as signals for G-tails on YLpFAT10 were determined by using native gels washed at different temperatures. Signals are plotted as % with respect to the same gel washed at 4°C (designated at 100%).

Figure 3. Constitutive G-tails are shorter in *mre11Δ* cells.

Top: DNA structure of the annealed model substrate DUP-16 and expected structure for TRFs. In DUP-16, the two nucleotides not corresponding to telomeric sequence and where strand displacement synthesis stops are indicated in red. Bottom: analysis of extension products by polyacrylamide gel electrophoresis. DUP-16 and/or TRFs were poly-A tailed, annealed to end-labelled poly-T+(C/A) oligo and subjected to an extension reaction using T4 DNA polymerase. Left gel: control reactions using DUP-16 alone; w/o dCTP: dCTP was omitted from the extension reaction. Poly-T+(C/A) indicates the position of the end labelled oligo alone and corresponds to position + 1 in terms of overhang size. Polymerized product: product of the extension reaction on DUP-16 covering the overhang only (+ 24); displacement product: product of the extension reaction reaching the 2 inversed G:C base pairs (+ 31). Right gel: purified TRFs from the indicated strains were subjected to the procedure. In the last two lanes, either DUP-16 or purified TRFs from a wt strain were treated with ExoI before the tailing reaction and then processed as the other samples. Size indications on right are with respect to overhang size.

Figure 4. Most yeast telomeres end with a G-tail.

A) Upper panel: genomic DNAs isolated from the indicated strains were first treated with Exonuclease I (labelled blunted) or mock treated (labelled native). DNAs were then mock-treated (labelled ExoIII -), or treated with Exonuclease III (labelled ExoIII +), before native gel analysis. Closed arrowhead: internal positive control for the ExoIII treatment (*Acc65I*-digested pRS304); open arrowhead: internal negative

control (*KpnI*-digested pRS314), revealed by the T7-probe. *KpnI*-digested TRFs are seen with the GT-probe only in lanes where genomic DNA was blunted with ExoI prior to ExoIII reaction. Lower panel: same gel as above after denaturation and rehybridization to a 2 μ m probe to show equal loading of DNA (indicated by asterisk). Controls and molecular size standards are as in fig. 1.

B) Percentage of telomeres ending with a G-tail was estimated by quantifying the amount of G-tail signals found on YLpFAT10 on native gels washed at 4°C (see fig. 2A). The values obtained were compared with signals detected for pGT19 and pGT22 fragments and were adjusted for the molecular ratio of hybridization targets on pGT19/pGT22 vs the YLpFAT10 plasmid (see Suppl. Materials). DNAs derived from three independent cultures of wt cells were used for quantification and the standard deviation is indicated.

Figure 5. S-phase dependent G-tail formation in *mre11* Δ -cells.

A cell synchronization experiment using *MRE11* and *mre11* Δ cells (AR120 and MLY40 strains) was performed as described in supplementary fig. 1. DNA isolated from each cell aliquot was analyzed for telomeric DNA end-structures by non-denaturing in-gel hybridization (Supplementary fig.2 and data not shown). The relative amounts for telomeric ssDNA on YLpFAT10 (in arbitrary units) were obtained by calculating the ratio of the G-tail signals retrieved on the native gel over the total amount of YLpFAT10 detected.

Figure 1

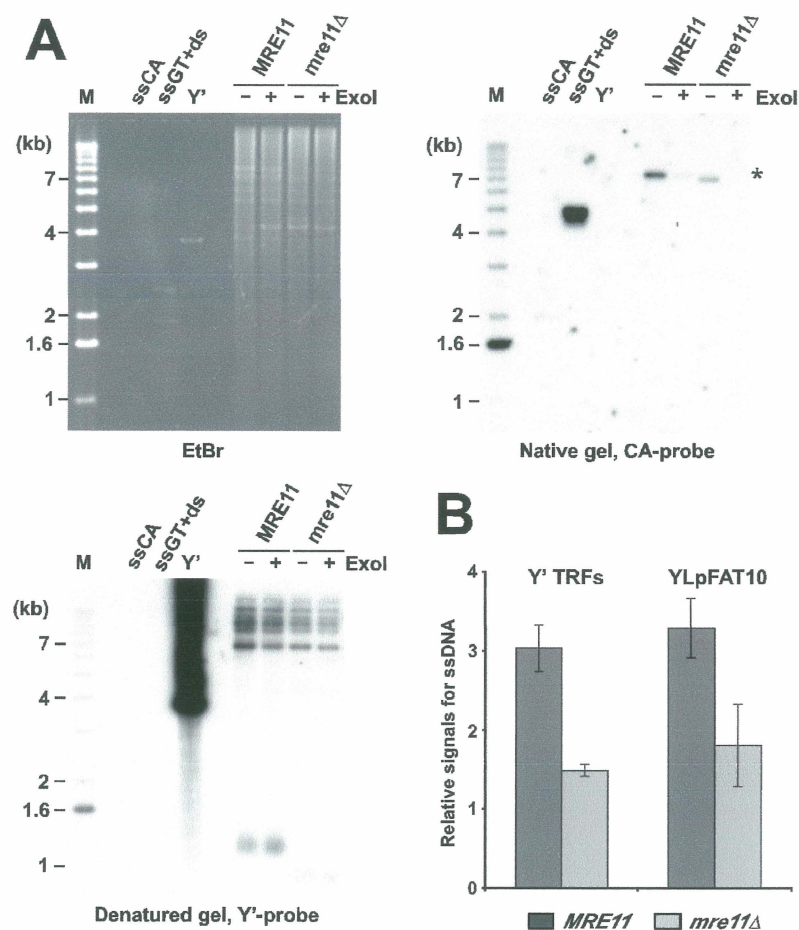


Figure 2

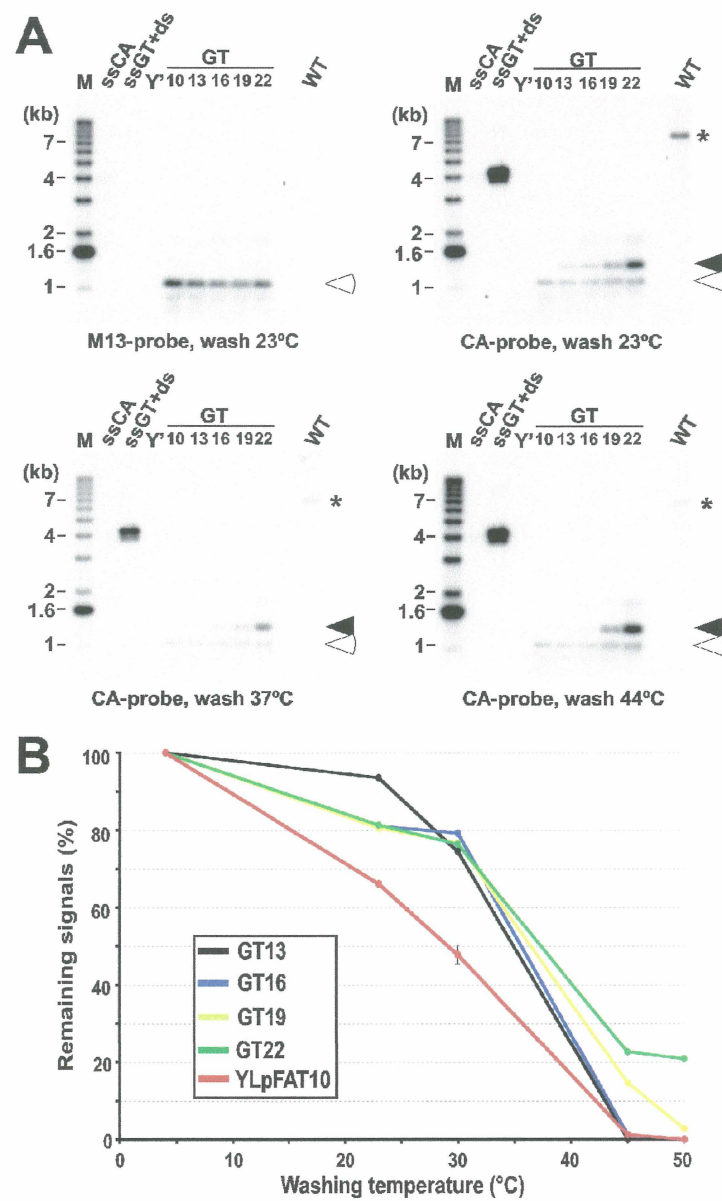


Figure 3

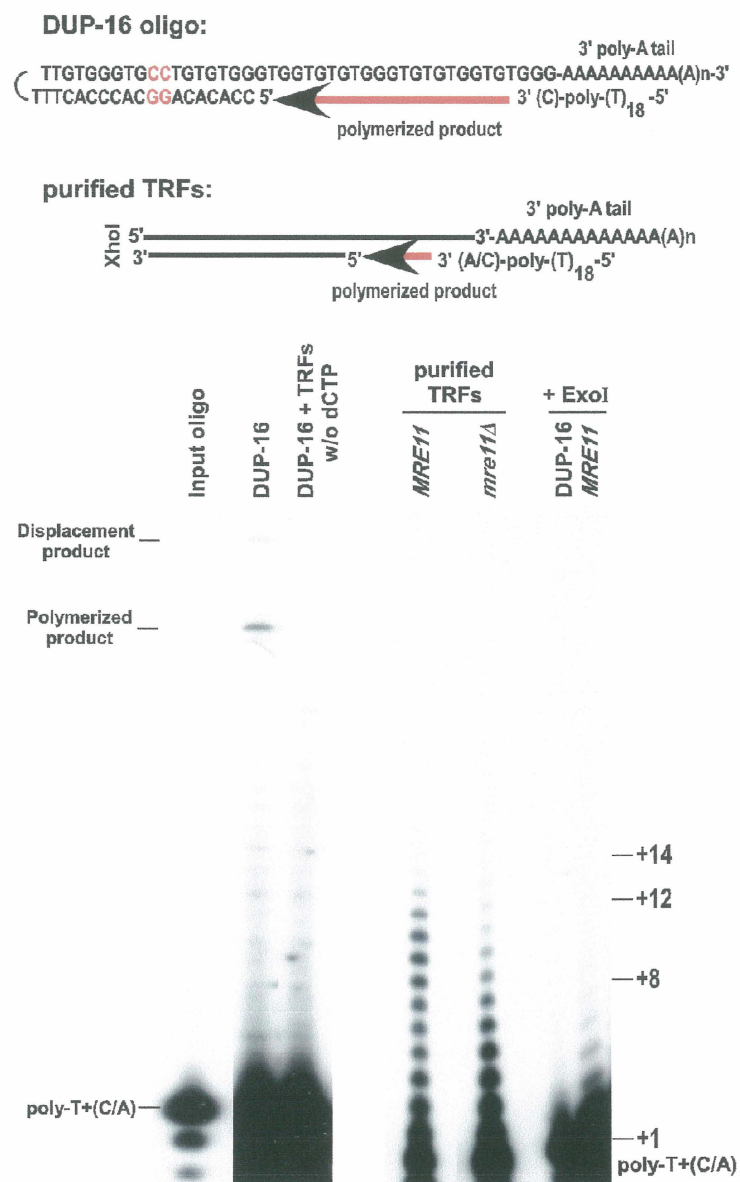


Figure 4

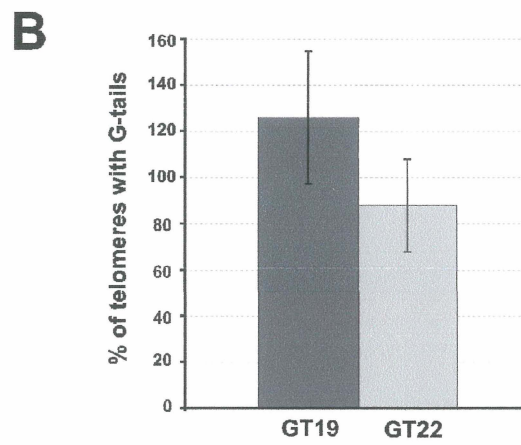
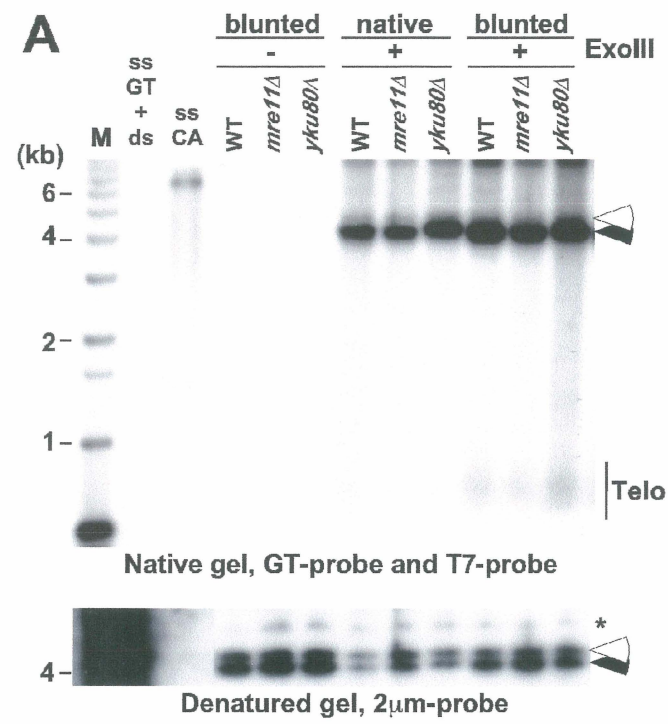
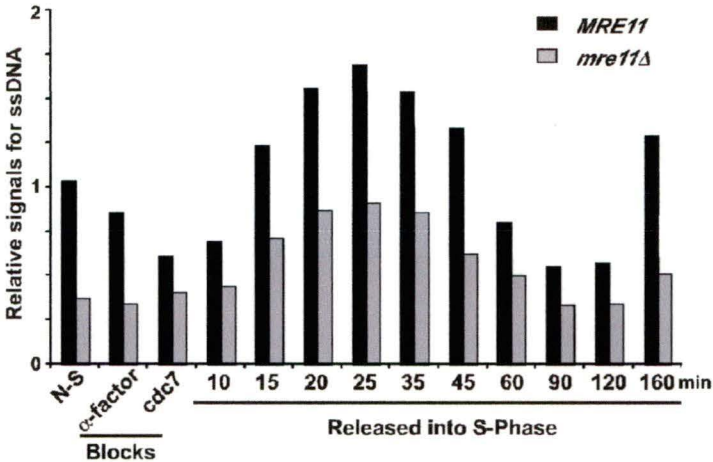


Figure 5



Supplementary Information:

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmids and media. Yeast strains 50181 (*MATa ade2 ade3 leu2 trp1 ura3 cyh2 SCRA::URA3*) and 50333 (*MATa mre11Δ::LEU2 ade2 ade3 leu2 trp1 ura3 cyh2 SCRA::URA3*) were from the Seattle yeast collection. Strains MLY50 (*bar1Δ::kanMX4*) and MLY51 (*mre11Δ::LEU2 bar1Δ::kanMX4*) were derived from strains 50181 and 50333 respectively, by deleting the *BAR1* gene using a PCR-deletion technique (Brachmann et al. 1998). MLY30 strain (*bar1Δ::HIS3*) was constructed by deleting the *BAR1* gene in BY4705a strain (Brachmann et al. 1998). The *MRE11* gene was deleted in AR120 strain (Raghuraman et al. 1994) to yield MLY40 (*mre11Δ::kanMX4*). The 7.5 kb linear YLpFAT10 plasmid was described previously (Wellinger et al. 1993a). The pGT22 plasmid contains 22 nucleotides that are perfectly complementary to the CA-probe (Dionne and Wellinger 1996), and the shorter derivatives (pGTxx) harbour stepwise shortened tracts of telomeric sequences, keeping xx nt of complementary sequences. Yeast growth media were as described previously (Rose et al. 1990), and cells were transformed by a modification of the lithium acetate methods (Gietz et al. 1992).

Cell growth and DNA isolation. Cell synchronization was performed as described (Wellinger et al. 1993a; Wellinger et al. 1993b) using AR120 and MLY40 strains containing YLpFAT10. Aliquots of cells at each time point were processed for DNA and FACS analyses (Gravel et al. 1998). Total yeast genomic and plasmid DNA were isolated using a modified glass beads procedure (Wellinger et al. 1993b).

DNA analyses. Non-denaturing in-gel hybridization conditions, exonuclease I (ExoI) treatments of DNA and the telomeric probes (CA, Y') were as described (Wellinger et al. 1993b; Dionne and Wellinger 1996). T7-Primer oligo (5'-AATACGACTCACTATAG-3') is referred to as the T7-probe, and the Universal M13 primer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') is referred to as M13-probe. For the ExoIII experiment, 1,5 µg total genomic DNA was incubated with 100U of enzyme for 75 sec, phenol extracted and precipitated in ethanol. The DNA was then digested with *KpnI* and analyzed by native in-gel hybridization. As internal control for ExoIII digestion, *Acc65I*-linearized pRS304 and *KpnI*-digested pRS314 were included. Note that the used enzymes leave a 4 base 5' overhang (*Acc65I*, positive control), or 4 base 3'-overhang (*KpnI*, negative control). Therefore, the ExoIII treatment is expected to resect one strand on the pRS304 plasmid only, which can be assayed with the T7-probe. As positive control, genomic DNA on which the telomeres were blunt-ended with ExoI prior to ExoIII treatment was used. Resection on the telomeres is assayed using the GT-probe. Finally, after denaturation of all DNAs, the gel was hybridized to a probe specific for 2 µm DNA to control for equal loading.

Quantitative analysis for the radioactivity in signals was obtained using a Molecular Dynamics PhosphorimagerTM SF or a Storm 860 with the MD ImageQuant software. Quantification of the signals in fig. 2B was carried out by determining the amount of signals obtained for respective bands at the indicated washing temperature with respect to the signals detected on the same gel first washed at 4 °C (set as 100%). The estimate for the amount of telomeres ending with G-tails (fig. 4B) was determined by

using native gels such as those shown in fig. 2 and washed at 4°C. G-tail signals detected on YLpFAT10 present in three independent wt strains were compared to the signals detected for GT19 and GT22 fragments. These signals were adjusted with respect to the molecular amount of target, which was obtained by quantifying the signals obtained after denaturation and hybridization to the T7-probe. The pGT19, pGT22 and YLpFAT10 plasmids contain one target sequence for this probe. Since the CA-probe is perfectly complementary to the targets on pGT19 and pGT22, and since we know that the size of G1-phase G-tails are less than 19 nucleotides, our prediction of the percentage of telomeres ending with G-tails is not overestimated.

- Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, and J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**: 115-32.
- Dionne, I. and R.J. Wellinger. 1996. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13902-7.
- Gietz, D., A. St Jean, R.A. Woods, and R.H. Schiestl. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**: 1425.
- Gravel, S., M. Larrivee, P. Labrecque, and R.J. Wellinger. 1998. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**: 741-4.

- Raghuraman, M.K., B.J. Brewer, and W.L. Fangman. 1994. Activation of a yeast replication origin near a double-stranded DNA break. *Genes Dev* **8**: 554-62.
- Rose, M.D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, and V.A. Zakian. 1993a. Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**: 4057-65.
- . 1993b. Saccharomyces telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51-60.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

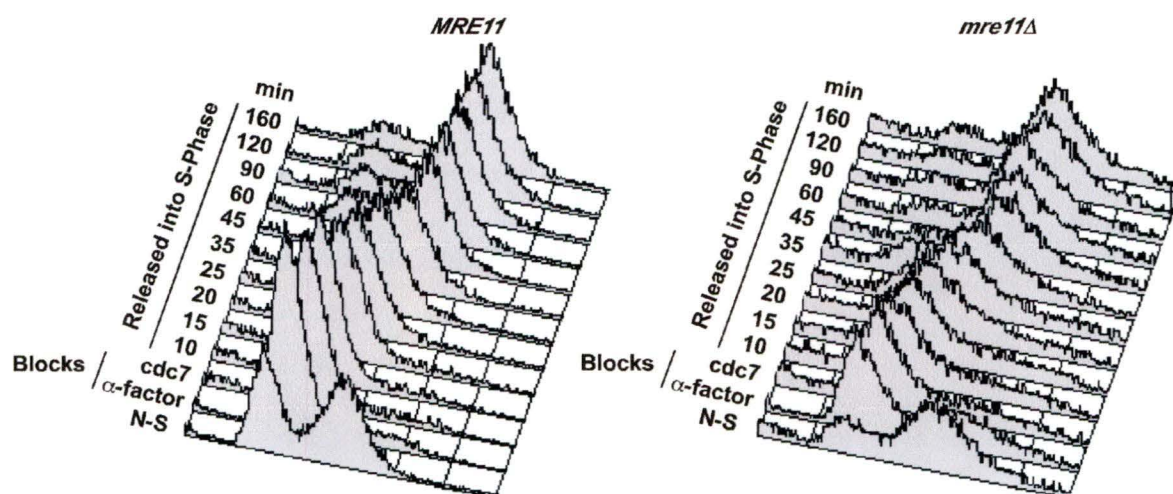
Supplementary figure 1. Cell-cycle profile analysis for *MRE11* and *mre11Δ* synchronized cells.

Cell synchronization with *MRE11 bar1 cdc7* and *mre11Δ bar1 cdc7* cells (AR120 and MLY40 strains). Synchronization of the cultures was performed as described above and cells were released into S-phase by a temperature downshift. Aliquots of cells were taken at different time-points during the experiment as indicated. For each sample, cells were fixed and DNA was stained with propidium iodide for FACS analysis. In terms of cell cycle synchrony, most of wt and *mre11Δ* cells reach S-phase 15 to 35 min after their release from the *cdc7* block.

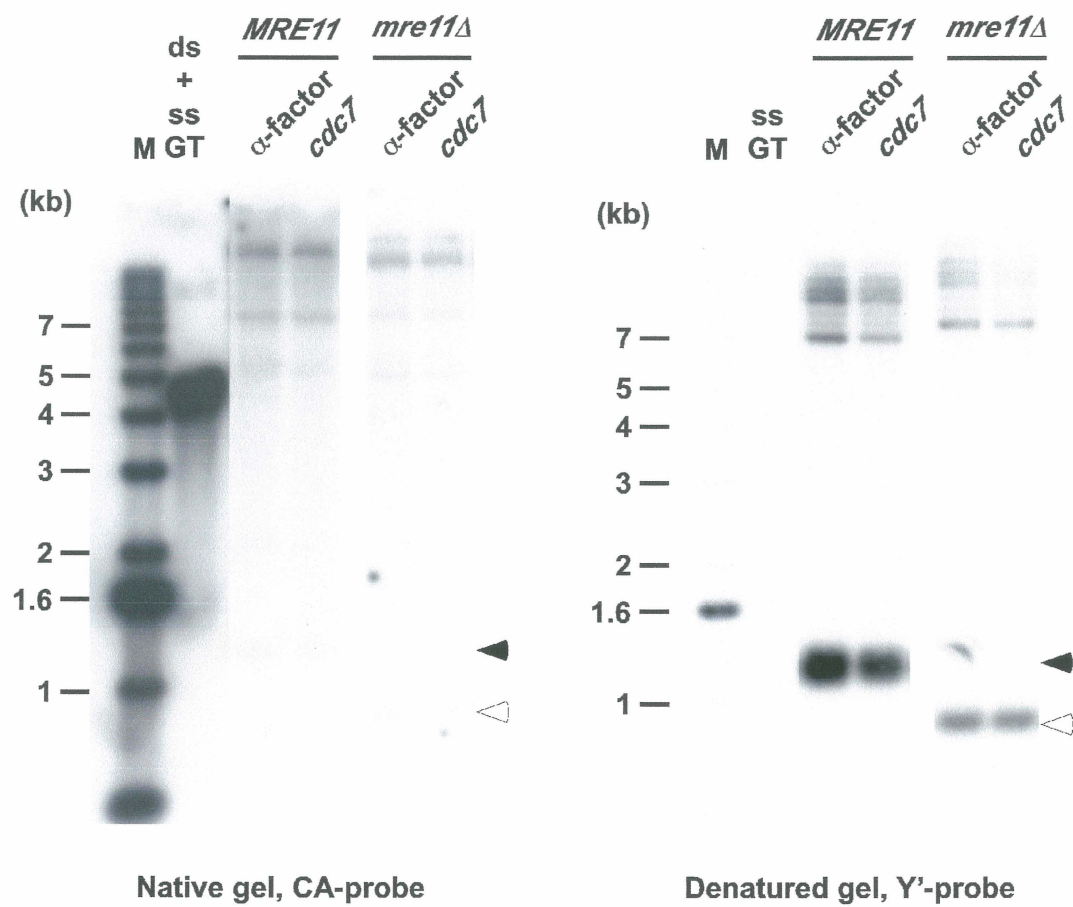
Supplementary figure 2. Faint G-tail signals are observed on Y' telomeres for G1-arrested cells.

DNA was isolated from G1-arrested cells described in supplementary fig.1 (lanes α -factor- and *cdc7*-arrested cells). Left panel: Analysis of DNA end-structures was performed by nondenaturing in-gel hybridization using the CA-probe as described in fig. 1. Right panel: After denaturing, DNAs were transferred onto a nylon membrane by Southern blotting and the resulting blots were hybridized to a Y'-probe. Controls and molecular size standards are as in fig. 1. Y'-TRFs are indicated by closed arrowheads for *MRE11* cells and by open arrowheads for *mre11* Δ cells.

Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



ARTICLE III

Larrivée, M. et R.J. Wellinger. 2005. Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states. Article soumis à *Nature Cell Biology*.

Préambule

Ce troisième manuscrit décrit la présence de séquences télomériques sous forme d'ADN extra-chromosomique dans des cellules de levure qui maintiennent leurs télomères en absence de la télomérase. Les survivants de type I possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques contenant une ou deux répétitions de l'élément sous-télomérique Y', alors que les survivants de type II possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques de tailles hétérogènes, partiellement sb et ne contenant que des séquences télomériques. Étonnamment, ces deux types de survivants peuvent vivre en absence de Cdc13p, une protéine normalement essentielle pour la protection des télomères. Ces nouveaux survivants (appelés $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II) possèdent également des cercles d'ADN extra-chromosomiques, mais ils ont des télomères différents de ceux des survivants de type I et de type II. De plus, le système de surveillance des dommages à l'ADN (appelé «checkpoint») semble être aboli dans les cellules $\Delta 13$. Cependant, la réintroduction d'une copie du gène *CDC13* dans ces mutants $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II permet de renverser les phénotypes, suggérant que les cellules se sont adaptées afin de survivre en absence d'une protection télomérique conventionnelle. Finalement, nous démontrons que les extrémités des chromosomes

chez les survivants de types I et ceux $\Delta 13$ semblent avoir une structure aberrante et anormale, suggérant la présence de formes intermédiaires de recombinaison aux télomères et/ou la dérégulation du maintien des séquences d'ADN télomériques. Ces travaux proposent donc que Cdc13p aurait le rôle de masquer les télomères de la reconnaissance par des «checkpoints» et que des cellules peuvent s'adapter en son absence via un maintien des chromosomes par recombinaison. J'ai réalisé toutes les expériences lors de ce travail et j'ai contribué à la rédaction du manuscrit.

Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states.

Key words:

Telomeres, chromosome capping, genome stability, adaptation.

Michel Larrivée and Raymund J. Wellinger*

*Corresponding Author:

Dept. of Microbiology and Infectious diseases

Faculty of Medicine

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Qc, J1H 5N4 (Canada)

Email: Raymund.Wellinger@Usherbrooke.ca

	Permitted	In Document
Opening paragraph	150	152
Body of text	2500	2280
Figures	5	5 (+ 4 Supplemental Figs.)
References	30	30

Maintaining telomeric DNA at chromosome ends is essential for genome stability^{1,2}. In virtually all organisms, the telomerase enzyme provides this function, but telomerase-independent mechanisms also exist^{3,4}. These latter mechanisms rely on recombination pathways to replenish telomeric DNA^{4,5} and extrachromosomal DNA may be implicated⁶. We report here that in *S. cerevisiae* cells, extrachromosomal circular DNA occurs for both subtypes of telomerase-independent telomere maintenance mechanisms. This DNA is comprised of circular molecules of full length subtelomeric repeat elements for the type I mechanism, and very heterogeneously sized and at least partially single-stranded circles of telomeric repeat DNA in type II cells. Surprisingly, both type I and type II cells can adapt to a loss of the normally essential telomere capping protein Cdc13p, inducing an alternate and reversible state of chromosome ends. Chromosome capping therefore is not strictly dependent on the canonical capping proteins, such as Cdc13p, but can be achieved in an unconventional fashion.

A dynamic protein complex ensures that telomeres, the ends of eukaryotic chromosomes, are distinguished from DNA double-strand breaks (DSB) and protected from degradation and deleterious repair processes, including end-joining^{2,7}. In virtually all organisms, telomere-specific repeat DNA comprises a double-stranded portion and an extension of the strand leading to the 3'-end of the chromosome, referred to as G-tails⁸. This

particular DNA arrangement is considered essential for the association of telomere capping proteins, such as the mammalian hPot1 and the yeast Cdc13p proteins and therefore thought to be crucial for genome stability⁹. The synthesis of telomeric DNA normally is dependent on the enzyme telomerase and telomere capping proteins are intimately associated with this mode of telomere maintenance^{9,10}. However, telomerase independent maintenance mechanisms do exist. Yet, telomeres must be distinguished from chromosomal breaks elsewhere in the genome, irrespectively of how telomeric DNA is maintained, and telomere stability has profound implications for cancer and ageing in humans^{2,11}.

In the yeast *S. cerevisiae*, telomeric DNA is composed of about 300 bp of G₁₋₃T/AC₁₋₃ repeat DNA and ends with a 3'-G-tail of about 15 nt^{8,12}. Proximal to these terminal repeats, on about 2/3 of the telomeres, normally there is at least one conserved subtelomeric sequence element, called Y' (5.2 or 6.7 kb, containing about 100 bp of telomeric repeats). An absence of telomerase in yeast causes a gradual shortening of terminal repeat DNA and an increase in the occurrence of cell cycle arrested cells until, after about 60 generations, the majority of cells cease to divide¹³. However, cells that regain the ability to divide and to maintain telomeric repeats by telomerase-independent mechanisms do emerge from such cultures and they are called survivors⁴. Previous analyses on the genetic requirements to generate survivors as well as the arrangement of the DNA on terminal restriction

fragments (TRFs) in them have led to the definition of two types of survivors (I and II). Rad52p is required for the generation of both types, but type I survivors also require Rad51p, while type II survivors require Rad50p^{4,14,15}. Thus, in order to investigate chromosome capping in these cells, we first generated individual survivor colonies from cultures of yeast cells that lacked an essential component of telomerase, the telomerase RNA, and either *RAD50* (*tlc1Δ rad50Δ*, generates type I) or *RAD51* (*tlc1Δ rad51Δ*, generates type II). As expected, type I survivors displayed a TRF pattern consisting of exclusively Y'-telomeres and very short terminal telomeric repeat tracts and in type II survivors, the TRFs were highly dispersed, but appear as discrete bands (Fig. 1a, b, denatured gels). In addition and as previously reported, Y'-elements are highly amplified in type I survivors (Fig. 1a, b). We used native in-gel hybridization to probe the end-structures of telomeres in these cells¹⁶. G-tail signals on the TRFs derived from type I survivors were virtually undetectable, as in normal cells (Fig. 1a, b, native gels). The DNA derived from type II survivors yielded a broad smear, essentially covering the entire lane. The DNA causing the smear was insensitive to *E.coli* exonuclease I digestion, which degrades single-stranded molecules with free 3'-ends (Fig. 1a), but was sensitive to mung bean nuclease, a single-strand DNA endonuclease (Fig. 1b). Probes specific for the C-strand telomeric DNA or single-stranded Y'-sequences did not reveal any signal on such native gels (data not shown), indicating that the single-stranded DNA corresponded to telomeric GT-strand DNA. There is also a light smeary mung bean nuclease-

sensitive signal in the lanes with DNA from type I cells, but it only extends upwards from 5 kb and is not coinciding with the TRFs at about 1 kb. We also analyzed the DNA structure at chromosome ends in these cells via pulsed-field gel electrophoresis (CHEF-gels) and non-denaturing hybridization, which showed that the signal for single-stranded DNA in type II survivors did not coincide with chromosomes (Fig. 1c). Instead, a faint smear of signal can be detected throughout the lane but the vast majority of hybridization signal remained in the well for these type II survivors (arrowhead, Fig. 1c). Such an absence of TRF-coinciding, or chromosome-coinciding, signals for G-tails strongly suggests that in both types of survivors, the actual G-tails at chromosome ends are comparable to normal cells. Hybridization of the DNA in CHEF gels after denaturation showed that chromosome ends of both types of survivors did contain telomeric repeats in double-stranded form, as expected (Supplemental Information, Fig. S1a). The characteristics of the signals detected by native gel hybridizations suggested the presence in survivors of at least partially single-stranded circular DNA comprising telomeric repeat DNA. In order to confirm this hypothesis, DNA derived from both types of survivors was analyzed by two-dimensional (2D) agarose gels, in which structured DNA molecules can be separated from canonical linear DNA¹⁷. While the migration in such gels of supercoiled molecules is hard to predict, relaxed circular forms of DNA will migrate to the approximate position according to their molecular weight as linear DNA in the first dimension, but be retarded with respect to linear DNA in the second dimension. Therefore

and as controls, we mixed into specific DNA preparations from cells three plasmids, all in supercoiled and relaxed circular form (Fig. 2, diagram). In DNA derived from type I survivors, discrete signals off the arc of linear DNA could be detected with probes specific for Y' or telomeric repeats, indicating free extrachromosomal Y' circular DNA (Fig. 2, Type I, black arrowheads). Two of the signals appear to comigrate with the marker-arc for relaxed circular molecules and migrate to sizes of about 6 and 12 kb. In addition, there are one strong and a weak signal comigrating with the arc for supercoiled circular DNA. These data indicate the presence of circular Y'-molecules containing one or two full repeats. For type II survivors, the probe specific of telomeric repeats revealed molecules migrating as an arc and in a position of the gel that is consistent with them being relaxed circular DNA molecules (Fig. 2, Type II, open arrowhead). In addition, in this case, the probe specific for Y'-elements did not reveal this arc, suggesting that the molecules contained exclusively telomeric repeats. For the DNA derived from type II cells, there is also a very strong signal overlapping the arc of linear double-stranded molecules and a very strong signal not entering the second dimension (middle panel, top left corner). Previous reports indicated that circular telomeric DNA can be difficult to resolve in these gels and may also break during migration, explaining the pattern seen here^{18,19}. Taken together, these data establish in both types of yeast survivor cells the occurrence of specific, at least partially single-stranded, extrachromosomal circular DNA.

These molecules could represent products of telomeric recombination and/or serve as reservoir for telomeric repeat maintenance.

Given that in normal cells, the essential yeast capping protein Cdc13p is directly associated with telomerase-mediated telomere maintenance^{20,21}, we next investigated whether survivor cells still required it. For this purpose, *tlc1Δ cdc13Δ*-cells containing the *cdc13-1^{ts}* allele on a plasmid (*pcdc13-1*) were first subcultured for about 150 generations to generate both types of survivors. The cells were then challenged with conditions selecting for loss of *pcdc13-1* and growth at elevated temperatures (Fig. 3a; Supplemental Information, Fig. S2). Surprisingly, colonies could be readily identified and Southern blotting of genomic DNA derived from them clearly demonstrates a complete absence of *CDC13* coding sequences (Fig. 3b). After about 80 generations of outgrowth, telomeres in such cells, which we name $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II (for CDC13-independent survivors type I and type II, respectively) displayed a new TRF pattern: on Southern blotting with denatured gels, DNA derived from $\Delta 13$ -I-cells displayed strong signals for amplified Y'-elements, but a complete absence of discrete TRF-bands (Fig. 1a,b). DNA from $\Delta 13$ -II cells now also displayed signals for amplified Y'-elements in addition to extremely heterogeneous hybridization for telomeric repeat DNA (Fig. 1a, b). Consistent with these observations, on the native gels, DNA derived from $\Delta 13$ -II-cells still yielded the smear of single-stranded circular GT-strand DNA, whereas $\Delta 13$ -I-cells yielded signals comparable to type I survivors before loss

of Cdc13p. In addition, as revealed by 2D gel analysis, DNA from $\Delta 13$ -I-cells contained a similar signal for amplified Y'-circles as do type I cells (Fig. 2), while DNA derived from $\Delta 13$ -II-cells now contained both, amplified Y'-circles and heterogeneous telomeric circles (Fig. 2). CHEF-gel analysis revealed that both, $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II-cells still contained linear chromosomes (Fig. 3c) and hybridization to denatured DNA using a CA-probe showed telomeric repeat DNA being associated with the linear chromosomes (Supplemental Information, Fig. S1b). Yet, native CHEF-analysis showed that telomeres in $\Delta 13$ -II-cells now end in long and readily detectable G-tails, which is not the case for $\Delta 13$ -I-cells (Fig. 3c). However, upon further growth of $\Delta 13$ -II-cells for up to 280 generations, the signal for single-stranded GT-DNA was progressively lost and a slight further amplification of Y'-elements was observed (Supplemental Information, Fig. S3). These data suggest that in $\Delta 13$ -II-cells, an absence of Cdc13p will result in the loss of the extensive terminal repeat tracts as well as the extrachromosomal GT-circles and these cells may eventually switch to a similar mode of chromosome end-maintenance as in $\Delta 13$ -I-cells. Regardless, the results demonstrate that in yeast survivor cells, the normally essential capping protein Cdc13p can become dispensable and that *cdc13 Δ* -cells still maintain linear chromosomes.

In order to further investigate the mechanisms allowing *cdc13 Δ* -cells to maintain linear chromosomes with physical ends, we examined the ability of $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II-cells to respond to DNA-damage and replication stress.

Surprisingly, both types of cells displayed much reduced phosphorylation of Rad53p, a central hallmark for checkpoint activation²², when exposed to 0.01% MMS (Fig. 4a). Furthermore, these cells were now very sensitive to MMS and HU, when grown on plates (Fig. 4b and Supplemental Information, Fig. S4a), suggesting that an abrogation of the cells' ability to induce cell cycle checkpoints is required for growth in the absence of Cdc13p. However, upon reintroduction of Cdc13p, both types of $\Delta 13$ -cells generated in this study could revert to relatively robust growth in the presence of MMS and HU (Fig. 4b), and their pattern of TRFs also reverted to those normally seen in type I and type II survivors (Supplemental Information, Fig. S4b). These results indicate that yeast survivor cells adapt to a loss of Cdc13p by abrogating checkpoint responses, suggesting that chromosome ends in these cells are in a structure that normally would induce checkpoints and cell cycle arrest. We also investigated the migration characteristics of chromosomal end-fragments in comparison to internal fragments from these survivor cells by CHEF gels. Internal fragments, such as a ~230 kb *NotI* fragment containing the *URA3* gene on chromosome V obtained from all strains analyzed migrate as discrete bands in the gel (Fig. 5c). However, as revealed by Y'-probing of the gel, fragments with one terminus obtained from type I survivors and both types of $\Delta 13$ -cells yield a highly heterogeneous pattern with few discrete bands (Fig. 5b). Given the presence in these latter three cell-types cells of extrachromosomal Y'-circular DNA (Fig. 2), we hypothesize that such circles could be associated with telomeres forming structures that would resemble

recombination intermediates mediated by the Rad51-family of proteins. Curiously, chromosomes as well as terminal fragments from survivor type II cells migrate relatively normal in CHEF gels (Figs. 1c, 5a, b), suggesting that the long terminal repeats tracts in these cells are capped as in wt cells.

These results demonstrate that maintaining telomeric ends of eukaryotic chromosomes and distinguishing them from DSB is extremely malleable. In yeast as in mammals, extrachromosomal circular DNA could supply the necessary reservoir for telomeric sequences for recombination-based telomeric repeat maintenance. Yeast type I survivors harbour circular Y'-elements, which also occur at very low levels in telomerase-positive cells²³. Type II contain free, heterogeneously sized and at least partially single-stranded GT-circles of telomeric repeat DNA, comparable to the situation in telomerase-negative human cells^{18,19} and in other yeast cells with a capping deficiency²⁴. Surprisingly, maintaining chromosome ends in budding yeast cells analyzed here can be achieved in the complete absence of Cdc13p (see also accompanying papers by Zubko and Lydall and Petreaca et al.), showing that chromosome end-stability and cell viability are not absolutely dependent on this class of capping proteins. We note that $\Delta 13$ -II-cells acquired extrachromosomal Y'-circles and that the TRFs in these cells became extremely heterogeneous with readily detectable G-tails (Figs. 1-3). This could indicate that in type II cells, Cdc13p contributes to stabilizing circular DNA with single-stranded portions of the GT-rich strand in addition to

chromosome ends. In its absence and with even longer outgrowth than performed here, these GT-circular DNAs may be lost completely and chromosome capping in cells lacking Cdc13p could therefore obligatorily involve Y'-circles as in $\Delta 13$ -I-cells. The data also demonstrate that the transition from *CDC13*⁺ survivors to *cdc13* Δ survivors is accompanied by a loss of DNA-damage checkpoint function and increased sensitivity to DNA-damaging agents. We interpret this result as suggesting that in $\Delta 13$ -cells, some chromosomes may end at a random position within the amplified Y'-elements. In *CDC13*⁺-cells, such ends would be recognized as DSB, followed cell cycle arrest and repair activities that restore canonical telomeric repeats and Cdc13p binding. In *cdc13* Δ -cells, telomeric repeats at the physical ends are not bound by Cdc13p and presumably not stabilized. Thus, eventually, DNA-damage checkpoints must be abrogated for continued cell divisions in such cells; a phenomenon termed adaptation^{25,26}. Our results are thus consistent with a prime role for Cdc13p to distinguish telomeric ends from DSB and therefore being required for an antichkpoint activity²⁷. Mechanisms similar to those suggested here, namely checkpoint abrogation and cell divisions in the presence of DSB, may also contribute to the genomic instability observed during onset of cell transformation in telomerase lacking human cells. Once telomerase reactivated, capping of telomeres can revert to be efficient, facilitating the ensuing cell amplification.

METHODS

Yeast Strains

Wild-type (Wt) cells (*Mata ade1 leu2 lys5 ura3 trp1*), type I survivor cells (*Mata rad50Δ::hisG' tlc1Δ::URA3 ade1 leu2 lys5 ura3 trp1*) and type II survivor cells (*Mata rad51Δ::LEU2 tlc1Δ::URA3 ade1 leu2 lys5 ura3 trp1*) were derivative spores of diploid strains CSHY76, CSHY91 and CSHY92¹⁵ (kindly provided by C. Greider). Strain LRY010 (*Mata yku70Δ::kanMX yku80Δ::kanMX*) is referred to as a *yku* control strain (M. Ricard, M. Larrivée and R.J. Wellinger, unpublished). Strains Δ13-I and Δ13-II were derived from the diploid strain UCC3535 (*Mata/Mataα tlc1Δ::LEU2/TLC1 ade2-101/ade2-101 leu2-Δ1/leu2-Δ1 lys2-801/lys2-801 ura3-52/ura3-52 trp1-Δ63/trp1-Δ63 his3Δ200/his3Δ200 DIA5-1/DIA5-1*)²⁸ (obtained from D. Gottschling) in which one allele of the *CDC13* gene was disrupted by the *natR* gene, removing coding sequences + 57 to + 2361 with respect to the initiation codon of *CDC13* (Fig. 3b). The resulting diploid strain MLY100 was transformed with plasmid *pcdc13-1*, and *cdc13Δ::natR* haploid spores containing *pcdc13-1* were isolated (see Fig. 3a, Supplemental Information, Fig. S2). These cells were grown for about 150 generations at 23°C and type I and type II survivor cells were identified. Finally, these type I and type II survivors were streaked two times on media selecting for cells that had lost the *pcdc13-1* plasmid. Such Δ13-I and Δ13-II cells were recovered and they were now able to grow at all temperatures (Supplemental Information, Fig. S2).

Plasmids

Single-stranded M13mp18(+) DNA (Amersham Biosciences) was used as a control for exonuclease I and mung bean nuclease treatments (Fig. 1). Plasmids pRS306 (4.4 kb), pRS425 (6.8 kb), and pRS317 (8.6 kb) were used as markers on 2D gels (Fig. 2). p13 Δ natR was derived from pVL438²⁰ (provided by V. Lundblad) by replacing a 2.3 kb *Xho*I-*Sac*II DNA fragment of the *CDC13* sequences with a 1.2 kb *Sac*II-*Sal*I DNA fragment containing the *natR* selection marker, conferring resistance to nourseothricin. To disrupt the *CDC13* gene in strain UCC3535, a 3.2 kb *cdc13* Δ ::*natR* DNA fragment from p13 Δ natR was used. Plasmid *pcdc13-1* was obtained by a gap-repair procedure. Briefly, a *Xho*I-*Sac*II DNA fragment was removed from the pVL438 plasmid and the remaining DNA fragment was introduced into a *cdc13-1*^{ts} strain. Repaired plasmids were recovered, introduced into MLY100 cells and haploid segregants were tested for complementation and telomeric phenotypes (data not shown). Plasmids used for complementation assays (Fig. 4, Supplemental Information, Fig. S4) were pRS314 and pRS316 (referred to as empty vectors), pAZ1 (referred to as p*TLC1*) and pVL438 (referred to as p*CDC13*).

DNA analyses

Total yeast genomic and plasmid DNAs were isolated using a modified glass bead procedure or a Hirt procedure designed to isolate low molecular weight DNA²⁹. Non-denaturing in-gel hybridizations, DNA probes and controls used were as described previously^{12,16}. Exonuclease I (New England Biolabs) and

mung bean nuclease (Amersham Biosciences) treatments on DNA were performed as described²⁹. Pulsed-field gel analyses (Clamped Homogeneous Electric Field agarose gels, CHEF-gels) were performed as previously described³⁰, except that the resulting agarose gel was subjected to non-denaturing in-gel hybridization rather than the standard Southern analysis. Neutral-neutral, two-dimensional agarose gels (2D-agarose gels) were carried out as described²⁹. The *CDC13* ORF probe consisted of a 2.3 kb *XhoI*-*SacII* DNA fragment of the *CDC13* gene (nucleotides +57 to +2361), and the *CDC13* promoter probe was a 0.5 kb *StuI*-*EcoRI* DNA fragment (nucleotides -101 to -623). Predicted sizes of restriction fragments using these probes (Fig. 3b): 8.4 kb detected by ORF and promoter probes on *pcdc13-1*; 5.1 kb detected by ORF and promoter probes on genomic locus of *CDC13*; 4.1 kb detected by promoter probe on genomic *cdc13Δ* locus.

MMS and HU sensitivity assays

For growth sensitivity assays on plates, exponentially growing cultures were 10 fold serially diluted and stamped on YEPD or SC plates containing 0,01% MMS or 50 mM HU. For acute exposure to MMS, exponentially growing cells were mock treated or treated with MMS by adding 0,01% MMS to the corresponding cultures for 90 min. Protein extracts were prepared using a modified glass bead method and proteins were separated by 8% SDS-PAGE. Western blotting was performed using a polyclonal anti-Rad53p antibody (kindly provided by D. Durocher) and signals revealed using horseradish

peroxidase-conjugated anti-rabbit antibodies with the ECL detection kit (Amersham Pharmacia Biotech).

REFERENCES

1. de Lange, T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* **21**, 532-40 (2002).
2. Ferreira, M.G., Miller, K.M. & Cooper, J.P. Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* **13**, 7-18 (2004).
3. Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S. & Reddel, R.R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* **14**, 4240-8 (1995).
4. Lundblad, V. & Blackburn, E.H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**, 347-60 (1993).
5. Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L. & Reddel, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* **26**, 447-50. (2000).
6. Tomaska, L., McEachern, M.J. & Nosek, J. Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles. *FEBS Lett* **567**, 142-6 (2004).
7. d'Adda di Fagagna, F., Teo, S.H. & Jackson, S.P. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**, 1781-99 (2004).
8. Chakhparonian, M. & Wellinger, R.J. Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet* **19**, 439-46 (2003).

9. Lundblad, V. Telomeres: taking the measure. *Nature* **424**, 926-7 (2003).
10. Vega, L.R., Mateyak, M.K. & Zakian, V.A. Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 948-59 (2003).
11. Smogorzewska, A. & de Lange, T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**, 177-208 (2004).
12. Larrivee, M., LeBel, C. & Wellinger, R.J. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**, 1391-6 (2004).
13. Lundblad, V. & Szostak, J.W. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**, 633-43 (1989).
14. Teng, S.C. & Zakian, V.A. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 8083-93 (1999).
15. Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E. & Greider, C.W. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**, 143-52 (1999).
16. Dionne, I. & Wellinger, R.J. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13902-7 (1996).

17. Friedman, K.L. & Brewer, B.J. Analysis of replication intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **262**, 613-27 (1995).
18. Cesare, A.J. & Griffith, J.D. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol* **24**, 9948-57 (2004).
19. Wang, R.C., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**, 355-68 (2004).
20. Chandra, A., Hughes, T.R., Nugent, C.I. & Lundblad, V. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev* **15**, 404-14. (2001).
21. Nugent, C.I., Hughes, T.R., Lue, N.F. & Lundblad, V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**, 249-52 (1996).
22. Sanchez, Y. et al. Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* **271**, 357-60 (1996).
23. Horowitz, H. & Haber, J.E. Identification of autonomously replicating circular subtelomeric Y' elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 2369-2380 (1985).
24. Groff-Vindman, C., Cesare, A.J., Natarajan, S., Griffith, J.D. & McEachern, M.J. Recombination at long mutant telomeres produces

- tiny single- and double-stranded telomeric circles. *Mol Cell Biol* **25**, 4406-12 (2005).
25. Lee, S.E. et al. *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**, 399-409 (1998).
 26. Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J. & Hartwell, L.H. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**, 1097-106 (1997).
 27. Michelson, R.J., Rosenstein, S. & Weinert, T. A telomeric repeat sequence adjacent to a DNA double-stranded break produces an antieckpoint. *Genes Dev* (2005).
 28. Wellinger, R.J., Ethier, K., Labrecque, P. & Zakian, V.A. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**, 423-33 (1996).
 29. Wellinger, R.J., Wolf, A.J. & Zakian, V.A. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**, 51-60 (1993).
 30. Ferreira, M.G. & Cooper, J.P. The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Mol Cell* **7**, 55-63 (2001).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Gottschling, C. Greider, V. Lundblad and D. Durocher for materials, and C. Nugent and D. Lydall for communicating results prior to publication. The members of the Wellinger are thanked for helpful comments.

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR # 12616) and a studentship of the Canadian MRC to ML.

RJW is a Chercheur-National of the FRSQ.

Author contributions: ML and RJW designed the experiments and ML performed all of them. RJW and ML wrote the paper.

The authors declare that they have no competing financial interests.

Correspondence and requests for materials should be addressed to RJW (email: raymund.wellinger@usherbrooke.ca)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Telomeric GT-strand signals in yeast survivors. **a** Genomic DNA of indicated yeast strains was mock-treated (-) or treated (+) with the *E.coli* exonuclease I (ExoI), before *Xho*I-digestion. Native gel (top panel) was hybridized to a telomeric CA-probe to detect GT-strands. The same gel was denatured and rehybridized to the CA probe (middle panel) to control for DNA amount and integrity. Mixed in single-stranded circular plasmid M13mp18 was used as nuclease control (bottom panel) and successful ExoI digestion is indicated by loss of signal in the native gel on the DNA derived from yku⁻ cells. Open arrowheads indicate the 5.2 and 6.7 kb Y'-elements. M: size marker. C: Controls for singled-stranded GT-rich DNA and double-stranded telomeric repeats. **b** Same procedure as in a, except that mung bean nuclease was used. **c** Native CHEF-gel hybridization to whole yeast chromosomes derived from survivors.

Figure 2. Extrachromosomal circular Y'-elements and GT-strand telomeric DNA in survivor cells. Two dimensional agarose gels were performed with DNAs derived from wild-type (Wt) or indicated types of yeast survivor cells. Three plasmids (4.4, 6.8 and 8.6 kb) were added to each genomic DNA sample, serving as standards for the migration of supercoiled or relaxed circular DNAs (see diagram). Control: mix of plasmids without genomic DNA. Filled arrowheads: circular Y'-elements. The upper two spots (arrowheads pointing down), running at about 6 kb and 12 kb, suggest relaxed circular

DNA with one or two Y'-elements, respectively. Arrowheads pointing up: two spots comigrating with the arc of supercoiled molecules. White arrowheads: arc of relaxed GT-rich telomeric DNA circles.

Figure 3. *CDC13*-independent type I and type II survivor cells. **a** Scheme used to generate yeast strains lacking Cdc13p and which were derived from type I or type II survivors ($\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II cells respectively). **a** DNAs were digested with *NheI* and the Southern blot was probed with a *CDC13* ORF DNA fragment (left) or with a DNA fragment derived from the promoter of *CDC13* (right). DNAs used are: Lane 1: *pcdc13-1* alone, 2: haploid *CDC13* cells, 3: heterozygous *CDC13/cdc13 Δ* diploid cells, 4: haploid *cdc13 Δ* cells containing *pcdc13-1*, 5: $\Delta 13$ -I cells, 6: $\Delta 13$ -II cells, M: size marker. **c** Left: Native CHEF-gel with chromosomes derived from $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II cells treated as in Fig. 1c. Right: the DNA in the gel was denatured and hybridized to an *ADE2*-probe which is present on both chromosomes V and XV in these strains.

Figure 4. Checkpoint activity in $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II cells. **a** Indicated yeast cells were mock treated (-) or exposed to 0.01% MMS (+) for 90 min, whole cell extracts prepared and analyzed for phosphorylation of Rad53p on a Western blot. Open arrowhead: unphosphorylated Rad53p, closed arrowhead: phosphorylated Rad53p. **b** Indicated plasmids were introduced into $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II cells and 10 fold serial dilution of cells were plated on regular media

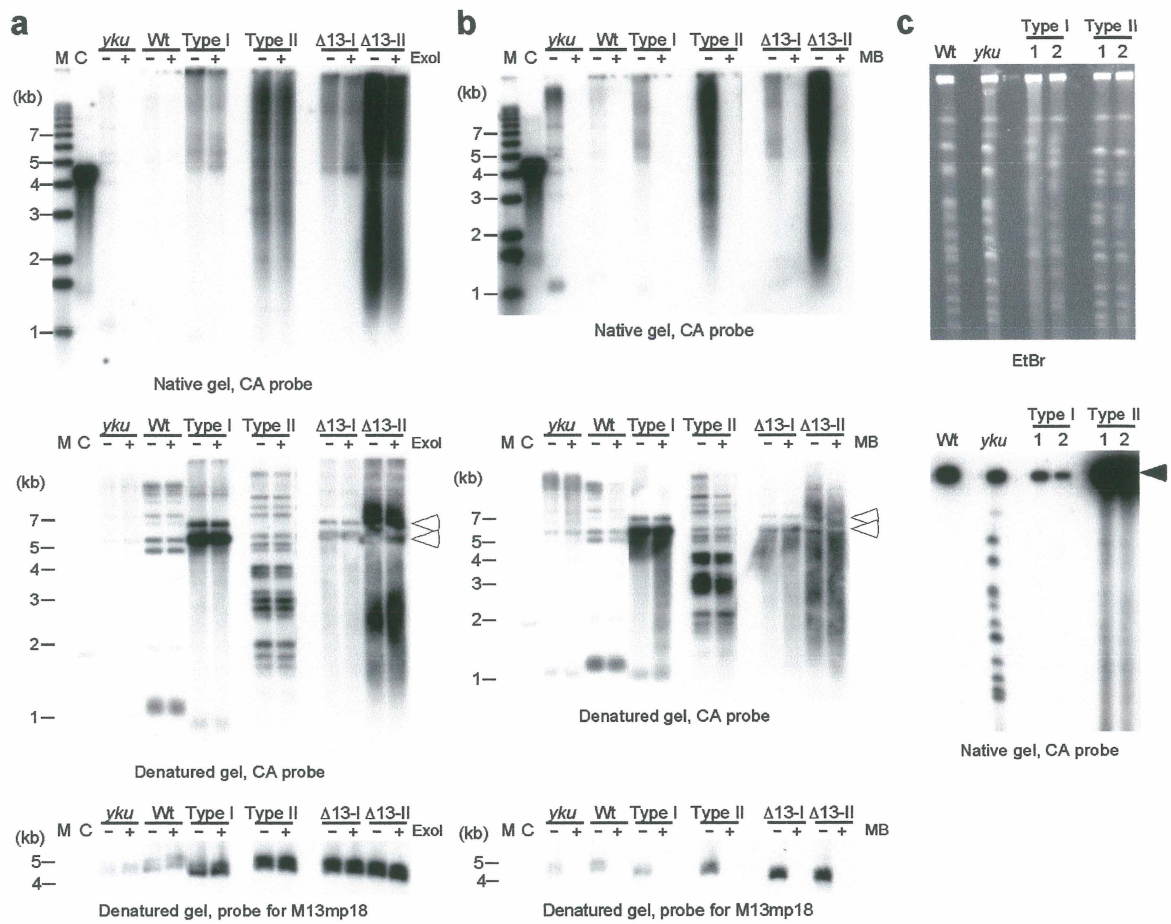
selecting for the two plasmids (left), the same media containing 0.01% MMS (middle), or containing 50 mM HU (right). Note that "-" for plasmids indicates that an empty vector with the same selection marker was used.

Figure 5. Aberrant migration patterns of terminal chromosome fragments in type I survivors and $\Delta 13$ -cells. **a** Ethidium-bromide stained CHEF-gel.

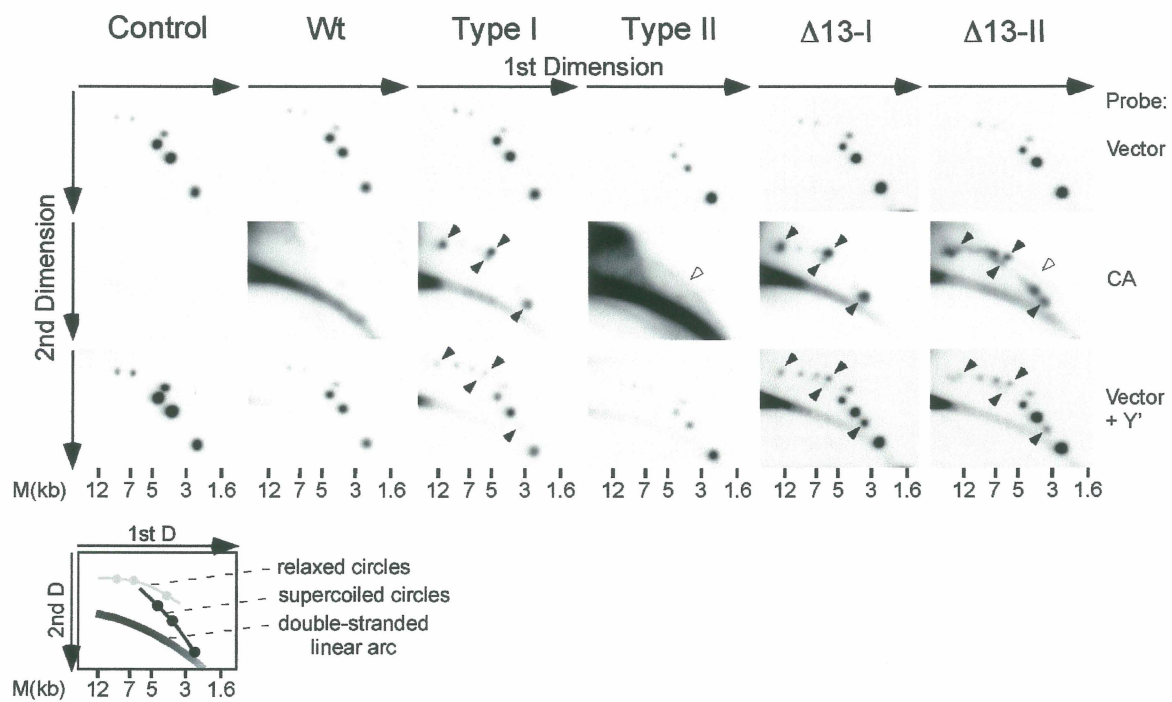
Chromosomes of the indicated strains were isolated for CHEF-gel analysis and digested with the *NotI* restriction enzyme in agarose plugs prior to loading on the gel. As control, chromosomes from wild-type cells (Wt) were run either undigested (ND) or digested (D). All other samples were digested and two independent clones of each cell type are shown.

M: lambda-DNA oligomers as CHEF-gel markers. **b** Same gel as in **a** hybridized to a Y'-specific probe. **c** Same gel hybridized to a probe specific for the *URA3* locus (about 230 kb fragment of chromosome V). Note that whole chromosome V migrates at about 550 kb and the signal for the undigested chromosome is therefore above the area shown here (data not shown).

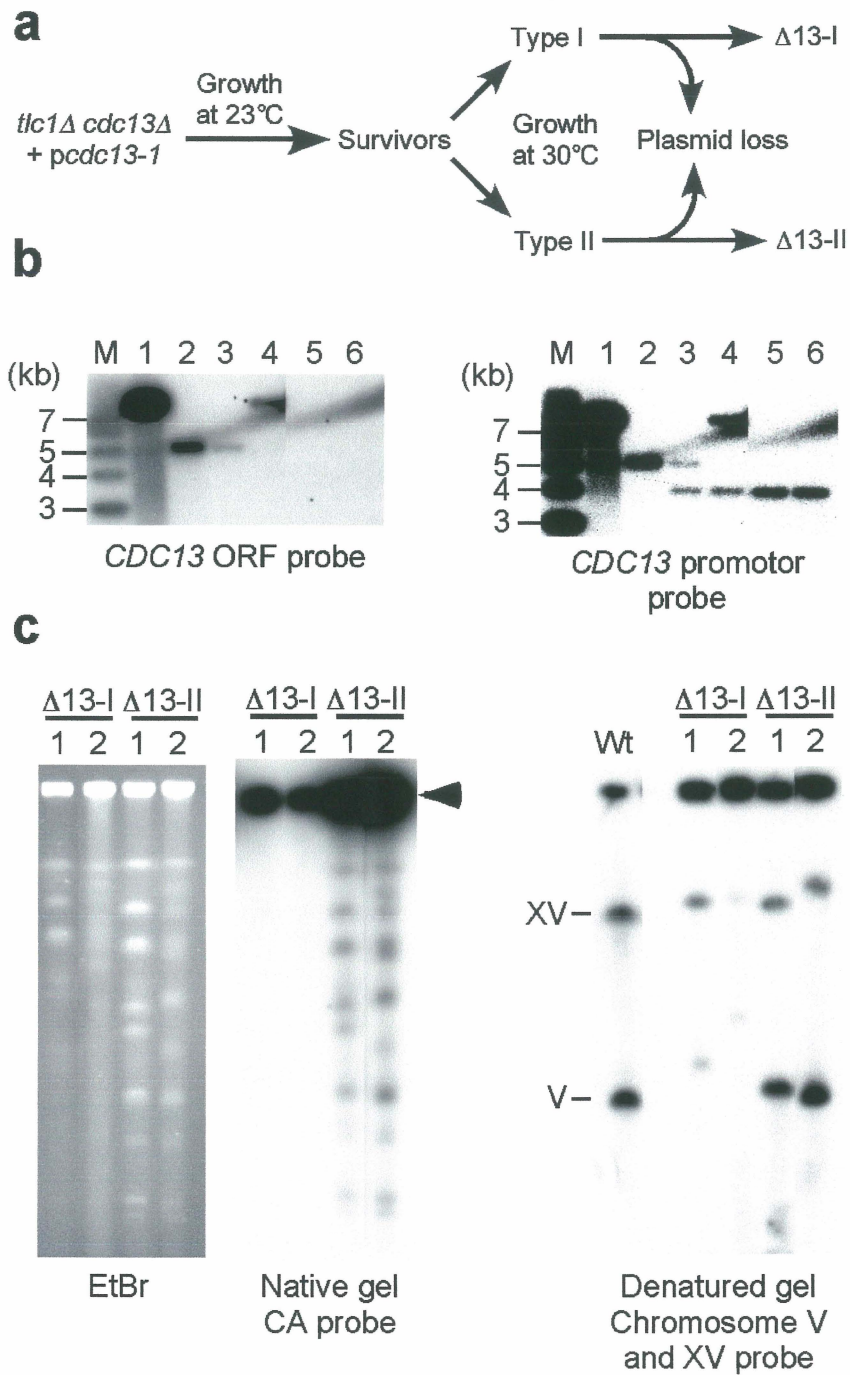
Larrivée, M. and Wellinger, R.J.
Figure 1

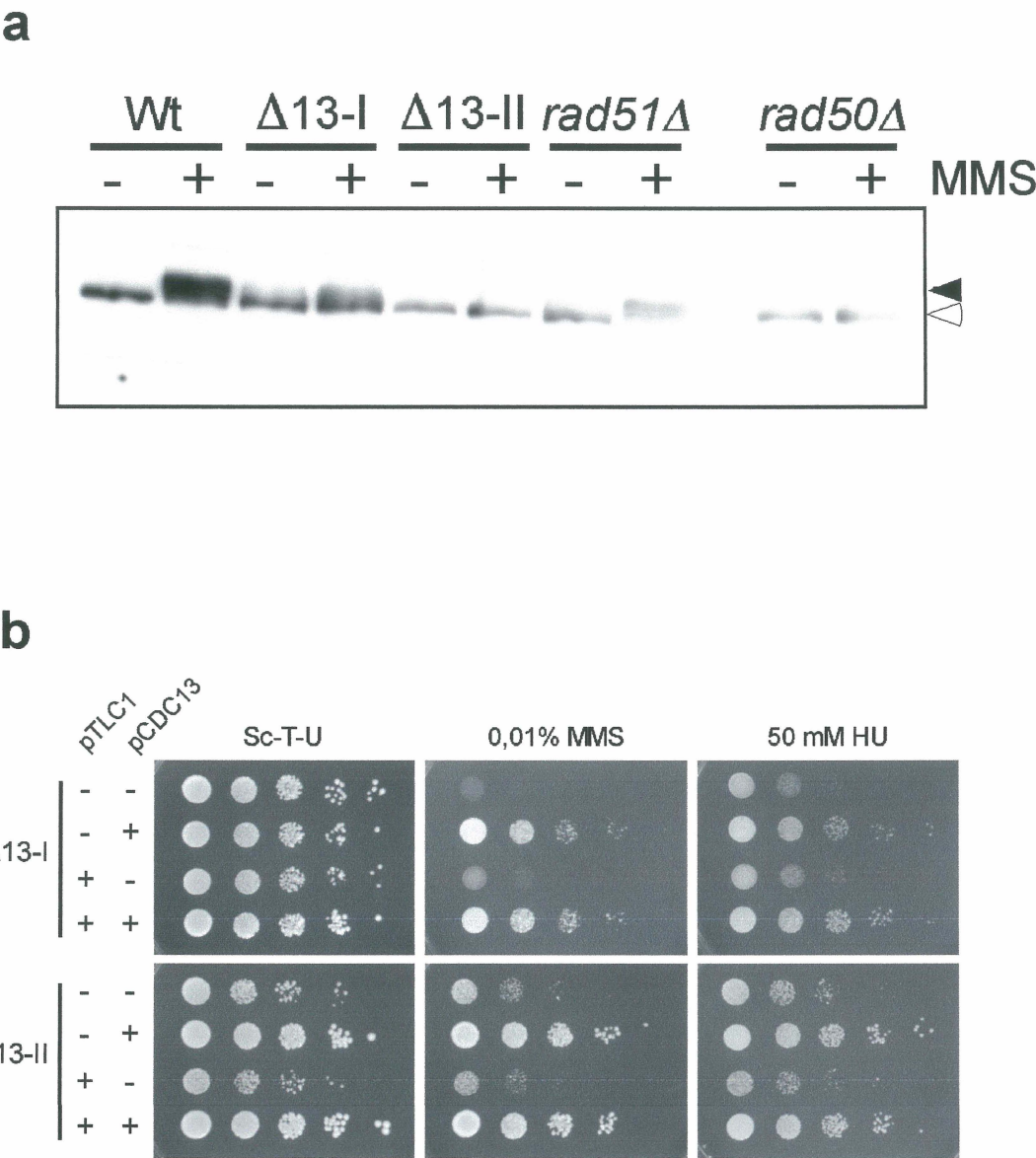


Larrivée, M. and Wellinger, R.J.
Figure 2

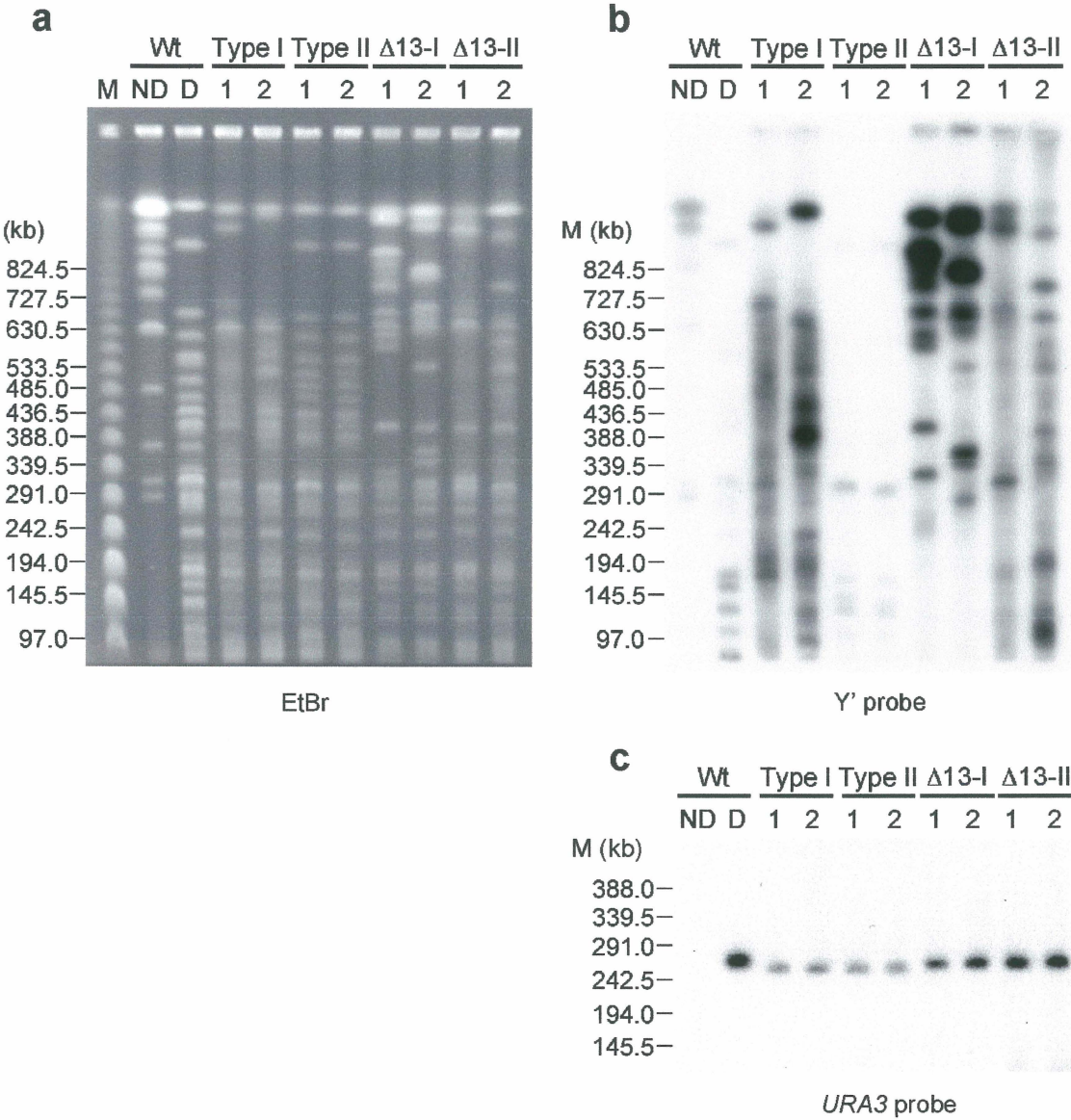


Larrivée, M. and Wellinger, R.J.
Figure 3





Larrivée, M. and Wellinger, R.J.
 Figure 5



Larrivée M. and Wellinger R.J.; Supplemental Information

Contents:

Supplementary Figure S1

Denatured CHEF gels with chromosomes derived from survivors.

Supplementary Figure S2

Generation of CDC13-independent survivor cells and their growth properties.

Supplementary Figure S3

Partial loss of GT-rich circular DNAs in absence of Cdc13p in $\Delta 13$ -II survivors.

Supplementary Figure S4

Sensitivities of $\Delta 13$ -cells to MMS and HU in comparison to control strains and reversibility of their TRF-patterns upon reintroduction of Cdc13p and/or TLC1.

Larrivée, M. and Wellinger, R.J.; Supplementary Information, Figure S1:
Denatured CHEF gels with chromosomes derived from survivors.

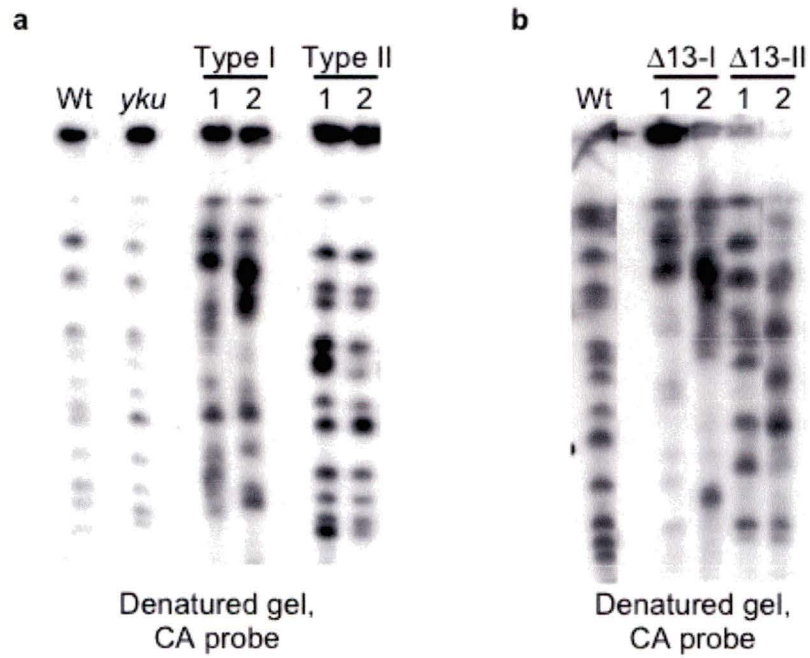


Figure S1. Denatured CHEF gels with chromosomes derived from survivors Type I, Type II, $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II.

a Same gel as shown in Figure 1c was denatured and hybridized to a CA probe.

b Same gel as shown in Figure 3c was denatured and hybridized to a CA probe.

Larrivée, M. and Wellinger, R.J.; Supplementary Information, Figure S2:
Generation of *CDC13*-independent survivor cells and their growth properties.

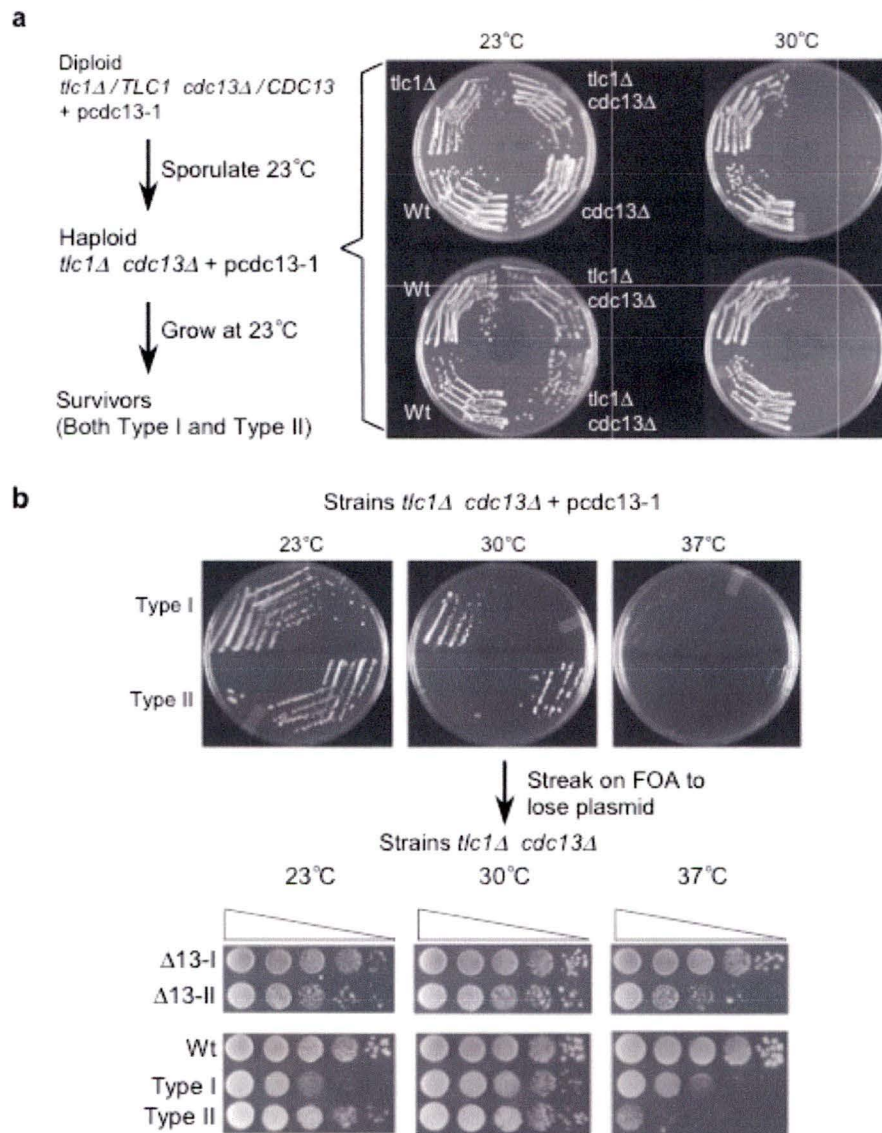


Figure S2. Generation of *CDC13*-independent survivor cells and their growth properties.
a *cdc13Δ* and *tlc1Δ cdc13Δ* haploid cells containing the *cdc13-1* allele on a plasmid (*pcdc13-1*) were isolated after sporulation and display the expected thermosensitivity phenotype at 30°C.
b Some Type I- and Type II-survivor cells derived from *tlc1Δ cdc13Δ* + *pcdc13-1* strain can grow at low frequency at 30°C but not at 37°C. Outgrowth of both types of survivor cells leads to capacity of those cells to lose the *pcdc13-1* plasmid on FOA. Δ13-I and Δ13-II cells can grow at all temperatures indicated.

Larrivée, M. and Wellinger, R.J.; Supplementary Information, Figure S3:
Partial loss of GT-rich circular DNAs in absence of Cdc13p in $\Delta 13$ -II survivors.

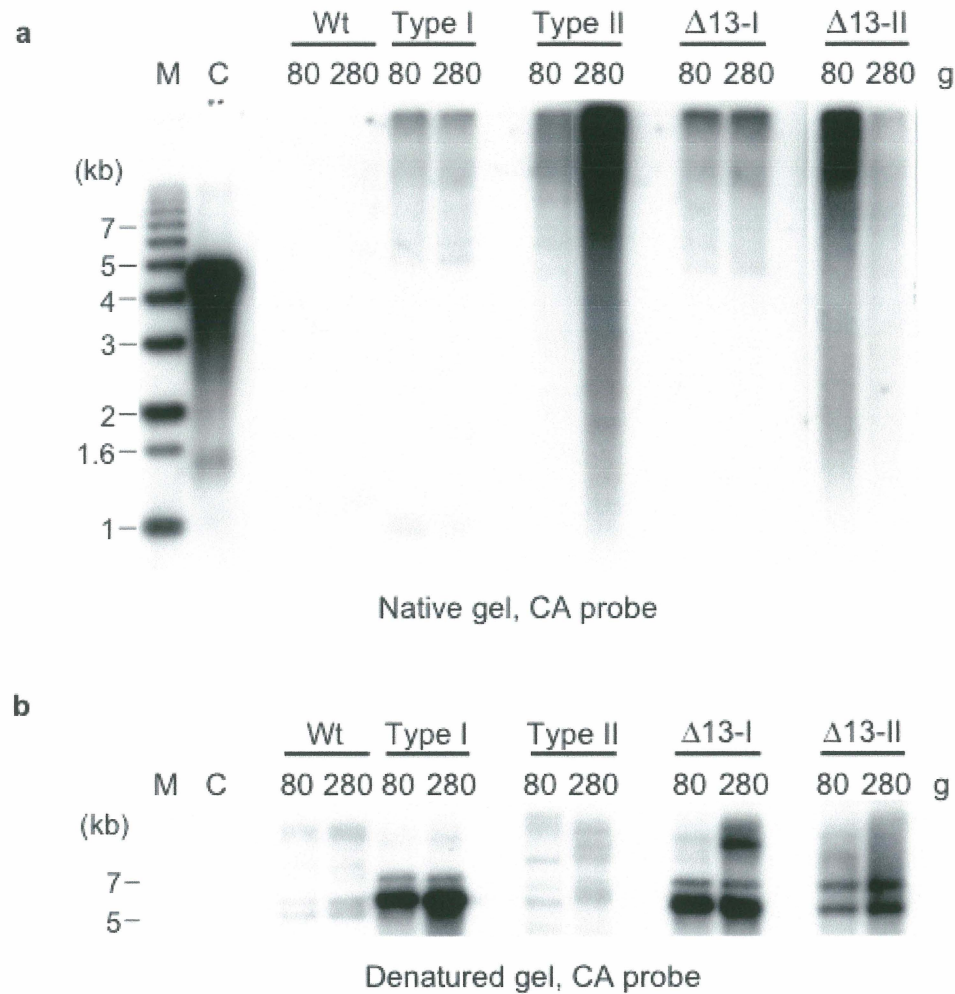


Figure S3. Partial loss of GT-rich circular DNAs in absence of Cdc13p in $\Delta 13$ -II survivors.
a The indicated yeast strains were grown for 80 or 280 generations (g) and genomic DNAs were analyzed by non-denaturing gel hybridization.
b The same gel was then denatured and hybridized to a Y'-probe for DNA loading control. M: size marker. C: Controls for singled-stranded GT-rich DNA and double-stranded telomeric repeats.

Larrivée, M. and Wellinger, R.J.; Supplementary Information, Figure S4:
Sensitivities of $\Delta 13$ -cells to MMS and HU in comparison to control strains and
reversibility of their TRF-patterns upon reintroduction of Cdc13p and/or TLC1.

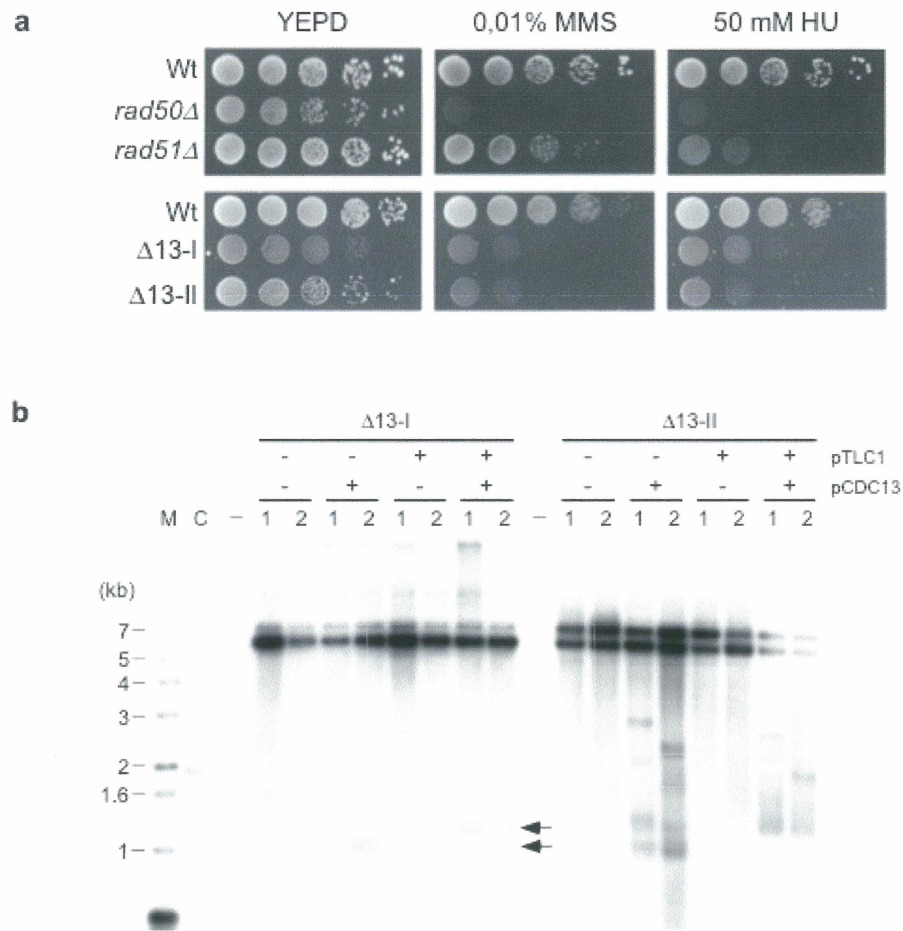


Figure S4. Sensitivities of $\Delta 13$ -cells to MMS and HU in comparison to control strains and
reversibility of their TRF-patterns upon reintroduction of Cdc13p and/or TLC1. **a** Ten-fold
serial dilution of indicated yeast strains were plate onto YEPA alone, YEPA containing
0.01% MMS or 50 mM hydroxyurea (HU). **b** The indicated plasmids were introduced
(labeled +) into $\Delta 13$ -I and $\Delta 13$ -II cells and cells were grown for about 130 generations.
In each case, empty vectors were introduced in yeast cells when no *CDC13* - or *TLC1*-
plasmid was used (labeled as -). Genomic DNA of two independent clones (1 and 2) of
each strain as in a was analyzed by Southern blotting. Membrane was hybridized to a Y'
probe. M: size marker. C: Controls for singled-stranded GT-rich DNA and double-stranded
telomeric repeats. Arrowheads indicate short TRFs (like Type I) after introduction of
Cdc13p alone, and about wt length TRFs after introduction of both Cdc13p and TLC1.

DISCUSSION

*La structure terminale des chromosomes chez *S.cerevisiae**

Les télomères retrouvés chez plusieurs organismes eucaryotes semblent posséder une signature universelle : ils se terminent par une extension 3' sb G-riche (revue dans Chakhparonian et Wellinger, 2003). Chez la levure *S.cerevisiae*, il a été démontré que les télomères acquièrent de longues extensions de plus de 30 bases à la fin de la phase S de façon indépendante à la télomérase (Wellinger et al., 1993b; Dionne et Wellinger, 1996; Wellinger et al., 1996). Par contre, les techniques utilisées auparavant ne permettaient pas de déterminer la structure terminale exacte des chromosomes à l'extérieur de la phase S. Nous avons donc examiné cette structure terminale en développant deux techniques différentes. Premièrement, l'utilisation d'un plasmide linéaire, qui se retrouve en plusieurs copies dans la cellule, nous a permis d'observer la présence de signaux télomériques sb beaucoup plus intenses sur gel non-dénaturant (Larrivée et al., 2004 : Figures 1 et 2). Nous avons utilisé cet avantage que procure le plasmide linéaire afin de réaliser des analyses quantitatives en utilisant des conditions variées d'hybridation de même que des fragments télomériques contrôles (plasmides pGTxx) (Larrivée et al., 2004 : Figure 2). Nous avons ainsi démontré que les télomères de levure se terminent avec une extension 3' de moins de 16 bases en G_T. Deuxièmement, nous avons obtenu des résultats similaires en développant une technique modifiée d'élongation d'amorces pour les télomères (Larrivée et al., 2004 : Figure 3). Par ailleurs, nous avons rapporté que ces

extensions se retrouvent sur la majorité des télomères de cellules Wt (Larrivée et al., 2004 : Figure 4). La présence d'extensions 3' télomériques de taille de 12 à 14 bases chez la levure concorde avec la longueur requise pour lier Cdc13p aux télomères (Hughes et al., 2000b). Il y aurait donc seulement une protéine Cdc13p liée directement sur l'ADN de chaque télomère de levure afin de protéger et de permettre le maintien de ceux-ci. De plus, ces résultats supportent l'hypothèse de l'existence d'une activité nucléase essentielle chez la levure afin de générer des extensions 3' sb télomériques aux deux extrémités des chromosomes (Wellinger et al., 1996). Cette structure terminale observée chez la levure semble donc être un motif conservé entre les différentes espèces eucaryotes. De façon similaire à la levure, les organismes ciliés tels *Tetrahymena*, *Oxytricha* et *Euplotes* possèdent des extensions de 14 à 21 bases du brin G-riche et un complexe protéique y est associé pour la protection télomérique (Klobutcher et al., 1981; Gottschling et Zakian, 1986; Henderson et Blackburn, 1989; Price, 1990; Fang et Cech, 1993; Jacob et al., 2001). D'une façon similaire à *S.cerevisiae*, des changements de la longueur de ces extensions télomériques ont été rapportés chez les ciliés après la réplication ou l'amplification de l'ADN macronucléaire (Jacob et al., 2001).

L'hétérodimère yKu et les extrémités des chromosomes

Le complexe Ku est un joueur clé dans le processus de réparation des cassures d'ADN db par NHEJ chez une grande diversité d'organismes (revue dans Downs et Jackson, 2004). Avant nos travaux, seulement quelques évidences chez la levure suggéraient que l'hétérodimère yKu70p/yKu80p pouvait être impliqué dans le

maintien des télomères : les souches ayant un complexe yKu inactif ont des télomères courts (Boulton et Jackson, 1996; Porter et al., 1996) et la sous-unité yKu70p interagit avec Sir4p *in vivo* (Tsukamoto et al., 1997). Le criblage d'une collection de souches mutagenéisées et thermosensibles de levure a été réalisé dans le laboratoire afin de trouver des gènes impliqués dans le maintien d'une structure normale des télomères. L'hypothèse de départ était que la présence d'une structure terminale anormale aux extrémités des chromosomes serait détectée par le système de «checkpoints» des dommages à l'ADN et provoquerait un arrêt en phase G₂/M. De cette façon, nous avons identifié le gène *YKU80* comme étant impliqué directement dans la biologie des télomères chez la levure (Gravel et al., 1998). En effet, nous avons démontré pour la première fois que le complexe yKu est associé aux télomères de levure (Gravel et al., 1998 : Figure 3). De plus, l'analyse de la structure terminale nous a révélé que des souches mutantes pour l'une ou l'autre des sous-unités possèdent de longues extensions 3' télomériques (Gravel et al., 1998 : Figure 1). Contrairement aux cellules Wt, ces longues extensions du brin G-riche sont présentes durant toutes les phases du cycle cellulaire et seraient d'une longueur d'environ 50 bases et plus (Gravel et al., 1998 : Figure 2 et données non publiées). De plus, l'absence de composantes importantes pour l'activité de la télomérase *in vivo* est synthétiquement létale lorsqu'elle est combinée avec l'absence du complexe yKu fonctionnel (Gravel et al., 1998 : Figure 4). Ces premières démonstrations de l'implication de Ku aux télomères n'ont été que le début d'une multitude d'études sur la caractérisation du complexe Ku chez différents organismes.

Afin de mieux discerner les rôles joués par le complexe yKu aux télomères, nous avons tenté de réaliser plusieurs types de criblages différents afin de trouver des mutations dans les gènes *YKU70* et *YKU80* qui permettraient de générer des séparations de fonction du complexe. Malgré le manque de succès par les différentes approches utilisées, nous avons collaboré avec le groupe de Feldmann et nous avons ainsi identifié un mutant de séparation de fonction (Driller et al., 2000). Lorsque les 25 derniers acides aminés en C-terminal de la protéine yKu70p sont enlevés, le complexe yKu peut toujours lier l'ADN de façon séquence indépendante et il conserve son activité de réparation des cassures d'ADN db par NHEJ. Cependant, le complexe modifié semble avoir perdu ses fonctions aux télomères (Driller et al., 2000). En effet, les cellules mutantes possèdent des télomères plus courts que les cellules Wt, de même que des extensions 3' télomériques plus longues (Driller et al., 2000). La partie C-terminale de yKu70p semble donc être importante pour l'action du complexe aux télomères, probablement via l'interaction avec un autre facteur cellulaire. En effet, il serait intéressant de réaliser un criblage chez la levure afin d'identifier des protéines pouvant se lier à cette région de yKu70p. De cette façon, nous pourrions cibler des protéines (connues ou non) ayant probablement des fonctions aux télomères de levure. Par ailleurs, la délétion des acides aminés en C-terminal de yKu70p provoque une thermosensibilité pour les souches mutantes, suggérant que ce phénotype serait relié à un problème télomérique et non à un problème dans le processus de réparation (Driller et al., 2000, données non publiées). En accord avec ce lien, il a été démontré que ce serait la perte prononcée des séquences télomériques db, et non la présence de longues extensions 3' télomériques,

qui causerait l'activation des «checkpoints» des dommages à l'ADN, l'arrêt en G₂/M et la thermosensibilité des cellules ayant un complexe yKu inactif (Teo et Jackson, 2001; Gravel et Wellinger, 2002; Lewis et al., 2002). Par ailleurs, trois autres groupes ont identifié des mutations dans le gène *YKU80* qui provoquent une séparation de fonction du complexe, c'est-à-dire que la réparation par NHEJ fonctionne dans les souches mutantes mais que leurs télomères sont altérés (Bertuch et Lundblad, 2003; Stellwagen et al., 2003; Roy et al., 2004).

Plusieurs travaux portant sur le complexe yKu ont été rapportés depuis et ceux-ci ont permis de mieux caractériser les rôles de l'hétérodimère yKu70p/yKu80p au niveau des télomères. Similairement à *S.cerevisiae*, il a été démontré que l'absence du complexe Ku fonctionnel provoque un raccourcissement des télomères chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Baumann et Cech, 2000; Manolis et al., 2001; Miyoshi et al., 2003), chez l'humain (Jaco et al., 2004; Myung et al., 2004) et chez la souris (d'Adda di Fagagna et al., 2001). Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés chez la souris (Samper et al., 2000; Espejel et al., 2002), de même que chez la plante *Arabidopsis thaliana* puisque des données indiquent que les télomères sont plus longs en l'absence de Ku (Bundock et al., 2002; Riha et al., 2002). En accord avec nos résultats, deux autres groupes ont rapporté que le complexe yKu est lié aux télomères de levure *S.cerevisiae* et ce, pendant tout le long du cycle cellulaire (Fisher et al., 2004; Schramke et al., 2004). De façon similaire, le complexe Ku se retrouve associé aux télomères chez la levure *S.pombe* (Miyoshi et al., 2003), de même que chez l'humain (Hsu et al., 1999; Hsu et al., 2000; d'Adda di Fagagna et al., 2001).

Selon les données cristallographiques obtenues du complexe Ku (Walker et al., 2001), cet hétérodimère serait probablement associé à la jonction db-sb des télomères. Des résultats obtenus chez la levure semblent favoriser cette hypothèse. En effet, des télomères ayant des répétitions télomériques modifiées chez *S.cerevisiae* sont toujours associés par le complexe yKu de façon indépendante de Rap1p et probablement du complexe Sir2-3-4p (Alexander et Zakian, 2003). Le complexe yKu semble également avoir un rôle au niveau de la formation de l'hétérochromatine télomérique, du moins chez la levure *S.cerevisiae*. En effet, les cellules dépourvues du complexe yKu actif ne possèdent plus la capacité de réprimer la transcription de gènes adjacents aux télomères (TPE) (Boulton et Jackson, 1998; Gravel et al., 1998; Laroche et al., 1998; Nugent et al., 1998). Ce phénotype doit probablement être dû à la perte d'interaction avec le complexe Sir2-3-4p (Tsukamoto et al., 1997; Roy et al., 2004). Contrairement aux études d'épistasie qui proposent que yKu agirait dans une voie différente de celle de la télomérase (Gravel et al., 1998; Nugent et al., 1998; Polotnianka et al., 1998), des évidences génétiques et biochimiques proposent que le complexe yKu régulerait positivement l'addition de séquences télomériques via son interaction avec l'ARN TLC1 de la télomérase (Singer et Gottschling, 1994; Singer et al., 1998; Peterson et al., 2001; Stellwagen et al., 2003; Fisher et al., 2004). Chez l'humain, le complexe Ku interagit avec hTERT, la composante catalytique de la télomérase (Chai et al., 2002). Ku pourrait donc être impliqué dans le recrutement de la télomérase aux télomères. Par ailleurs, lorsque le complexe yKu est inactif dans la cellule, la présence de longues extensions d'ADN sb aux télomères suggère que l'hétérodimère yKu70p/yKu80p protégerait ces derniers contre la dégradation par des

nucléases (Gravel et al., 1998; Polotnianka et al., 1998). En effet, ces longues extensions télomériques sont créées dans le mutant de façon indépendante à la télomérase (Gravel et Wellinger, 2002). De plus, des résultats ont démontré que lorsque Exo1p (une exonucléase 5' → 3' impliquée dans plusieurs processus de recombinaison) est absent, les extensions 3' télomériques retrouvées dans des souches *yku-* sont d'une taille similaire aux cellules Wt, ce qui indique une absence de dégradation du brin C-riche (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées; Maringele et Lydall, 2002). Ainsi, le complexe yKu serait également important aux télomères de levure afin de les protéger contre la dégradation par Exo1p. Le rôle de protection du complexe Ku contre la dégradation du brin C-riche télomérique par des nucléases a également été suggéré chez d'autres organismes grâce à des évidences obtenues chez la levure *S.pombe* (Kibe et al., 2003), chez la plante *Arabidopsis* (Riha et Shippen, 2003) de même que chez l'humain (Myung et al., 2004). Chez tous ces organismes, de longues extensions 3' télomériques sont présentes lorsque les fonctions du complexe Ku sont affectées. De plus, lors de cassures d'ADN db dans le génome, yKu protège les extrémités contre la dégradation du brin se terminant en 5' (Lee et al., 1998). En plus de ce rôle de protection contre les nucléases, plusieurs évidences suggèrent aussi que yKu protégerait les télomères contre des événements de recombinaison inappropriés (Polotnianka et al., 1998; Fellerhoff et al., 2000; DuBois et al., 2002). Chez les mammifères, l'absence du complexe Ku fonctionnel aux télomères provoque une instabilité génétique dans les cellules, résultant entre autres de fusions télomère-télomère (Bailey et al., 1999; Hsu et al., 2000; Samper et al., 2000; d'Adda di Fagagna et al., 2001; Gilley et al., 2001; Jaco et al., 2004; Myung

et al., 2004). Tous ces résultats démontrent donc que le complexe Ku possède des rôles bien distincts aux extrémités des chromosomes et lors des cassures d'ADN db. Lorsque présent aux télomères, ce complexe doit protéger les télomères de façon à les masquer des protéines impliquées dans la reconnaissance des dommages à l'ADN ainsi que celles impliquées dans les processus de NHEJ.

Le complexe MRX aux télomères

En plus d'être impliqué dans des processus de recombinaison, le complexe MRX chez la levure semble avoir un rôle à jouer au niveau des télomères et il est reconnu pour avoir des activités nucléases diverses (revue dans D'Amours et Jackson, 2002). Puisqu'il semblait être un candidat potentiel, nous avons vérifié l'implication possible du complexe MRX au niveau de la création des extensions 3' télomériques. Nous avons ainsi démontré que des mutants *mre11Δ* et *rad50Δ* possèdent des extensions sb du brin G-riche plus courtes que celles présentes aux télomères de cellules Wt (Larrivée et al., 2004 : Figures 1 et 3, données non publiées). La longueur des extensions sb télomériques serait majoritairement de moins de 8 bases chez ces mutants. Ainsi, le complexe MRX serait impliqué dans la création des extensions G-riques et/ou dans la régulation de ce processus. Diede et Gottschling ont également obtenu des résultats suggérant l'implication du complexe MRX dans la formation d'extensions 3' télomériques (Diede et Gottschling, 2001). Par contre, leurs travaux n'ont pas été réalisés sur les extrémités des chromosomes natifs, mais plutôt sur un télomère formé *de novo* après une coupure d'ADN db avec l'endonucléase HO à l'intérieur d'un chromosome. Cette situation est particulièrement différente du

contexte naturel puisque les télomères sont initialement reconnus comme étant des cassures d'ADN db (Michelson et al., 2005). Nos résultats démontrent aussi que le complexe MRX n'est pas essentiel pour la création des extensions 3' télomériques. En effet, les télomères analysés dans les mutants du complexe ne se terminent pas en bout franc, mais ils possèdent de plus courtes extensions du brin G-riche que celles des cellules Wt (Larrivée et al., 2004 : Figures 1, 3 et 4). Ainsi, une activité nucléase supplémentaire, mais probablement moins efficace, existerait chez la levure afin de palier au manque du complexe MRX. Nos résultats suggérant la présence d'une activité nucléase redondante au complexe MRX sont consistants avec le fait que les processus de réparation du locus *MAT* et de la formation *de novo* d'un télomère ne sont pas complètement abolis pour des souches mutantes (Ivanov et al., 1994; Diede et Gottschling, 2001). De plus, on peut supposer que la création des extensions du brin G-riche est essentielle pour la survie cellulaire; l'absence d'extensions 3' télomériques empêcherait la liaison des protéines impliquées dans la protection des télomères (le complexe Cdc13p) et ne permettrait pas le maintien normal des télomères par la télomérase. Ainsi, la présence d'une nucléase redondante au complexe MRX serait importante afin d'éviter la létalité des souches mutantes. La protéine Exo1p a déjà été caractérisée comme étant une nucléase redondante à Mre11p à différentes phases du cycle cellulaire (Chamankhah et al., 2000; Tsubouchi et Ogawa, 2000; Moreau et al., 2001; Lewis et al., 2002; Llorente et Symington, 2004; Nakada et al., 2004). Au niveau des télomères, des résultats obtenus par le groupe de Lydall suggèrent que Exo1p serait une nucléase impliquée dans la création des longues extensions 3' télomériques dans les mutants *cdc13-1* et *yku70Δ*

(Maringele et Lydall, 2002; Zubko et al., 2004). Par contre, la double délétion des gènes *EXO1* et *MRE11* est viable chez la levure (Tsubouchi et Ogawa, 2000), un résultat qui est contraire à ce qu'on pourrait s'attendre s'il n'y avait plus d'activité nucléase aux télomères de levure. En plus de *EXO1*, d'autres gènes encodant des protéines qui possèdent un motif exonucléase 5' → 3' ont été étudiés dans le laboratoire (*DIN7*, *YEN1*, *RAD17*, *RAD24*), mais aucune délétion d'un de ces gènes ne semble avoir un effet sur la taille des télomères et sur la quantité de signaux sb télomériques observés (Dionne, I., S. Gravel, J. Parenteau et R.J. Wellinger, données non publiées). Par contre, ces analyses de la structure terminale n'ont pas été réalisées avec des techniques sensibles comme celles décrites par nos travaux (Larrivée et al., 2004), de même que des études de létalité synthétique avec les composantes du complexe MRX n'ont pas été effectuées. Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, le complexe Mre11 serait également impliqué dans la création d'extensions 3' télomériques, mais il y aurait tout de même la présence d'une autre nucléase capable d'agir aux télomères (Tomita et al., 2003). Ainsi, d'autres nucléases agissant sur les télomères restent encore à être découvertes. Par ailleurs, nous avons démontré que de plus longues extensions 3' télomériques peuvent être créées à la fin de la phase S dans les souches *mre11Δ*, comme dans la situation des cellules Wt (Larrivée et al., 2004 : Figure 5; Wellinger et al., 1993b). Ces longues extensions 3' détectées pourraient être le résultat de la nucléase redondante au complexe MRX et/ou de l'activité de la télomérase. Les données suggèrent également que les extensions G-riches présentes dans les cellules *mre11Δ* sont toujours plus courtes que celles des cellules Wt, peu importe les phases du cycle cellulaire (Larrivée et al., 2004 : Figure

4). Cependant, à cause des inconvénients de la technique utilisée, nous ne pouvons pas conclure que cette situation est réelle lors de la phase S. En effet, le relâchement des deux types de cellules (Wt et *mre11Δ*) après l'arrêt en G₁, suivi de leur entrée en phase S, ne permet pas de garantir l'obtention d'un nombre identique de cellules à un temps donné dans le cycle. Par exemple, 25 minutes après le relâchement des cellules en phase S, il pourrait y avoir 90% des télomères qui sont en processus de réplication pour les cellules Wt comparativement à seulement 30% pour ceux des cellules *mre11Δ* (Larrivée et al., 2004 : Figure 5). Ce n'est peut être qu'au temps 30 minutes qu'il y aura 90% des télomères qui seront en processus de maturation chez le mutant. Dans ce cas, il aurait été possible d'observer une plus grande quantité d'ADN sb télomérique au temps 30 minutes pour les mutants *mre11Δ* par rapport aux cellules Wt. Ainsi, avec les résultats obtenus de cette expérience, tout ce que nous pouvons conclure est que les souches de levure dont le complexe MRX est inactif possèdent de plus courtes extensions en phase G₁ que dans le cas des cellules Wt et que de plus longues extensions peuvent également être créés chez les mutants à la fin de la phase S (Larrivée et al., 2004 : Figures 1, 3 et 5). Nos résultats suggèrent également que la liaison *in vivo* de Cdc13p aux télomères requiert moins de 11 bases, la longueur préalablement déterminée *in vitro* (Hughes et al., 2000b), ou qu'il existe un mode de liaison alternatif de Cdc13p sur de courtes extensions télomériques. Curieusement, le groupe de Zakian a démontré que la liaison de Cdc13p n'est pas affectée dans les souches de levure dont un des gènes du complexe MRX est inactif (Tsukamoto et al., 2001). Finalement, la présence d'extensions sb télomériques de plus de 8 bases aux télomères de mutants dans le complexe MRX pourrait correspondre aux télomères

répliqués par la synthèse du brin retardé. En effet, les amorces d'ARN ont une taille de 8 à 12 bases chez la levure et selon le positionnement de cet amorce à l'extrémité du chromosome lors de la réplication, la dégradation de l'ARN va générer une extension télomérique du brin G-riche de plus de 8 bases (voir Introduction, Figure 4A). Puisqu'il y a une grande quantité d'extensions 3' télomériques de moins de 8 bases chez les mutants *mre11Δ*, on peut supposer que le complexe MRX agirait sur le télomère répliqué par la synthèse du brin avancé, dégradant alors le brin C-riche du bout franc créé à ce télomère. Nos résultats vont également dans la même direction que ceux obtenus chez les mammifères. En effet, le complexe MRN chez l'humain semble être actif aux télomères en phase S et serait probablement impliqué dans la formation du t-loop et/ou la réplication des télomères en générant des extensions du brin G-riche (Zhu et al., 2000).

Plusieurs activités nucléases ont été proposées pour le complexe MRX chez la levure (revue dans D'Amours et Jackson, 2002). Un domaine nucléase a été identifié dans la protéine Mre11p, mais des mutations dans ce motif ne semblent pas affecter l'état des télomères comparativement à l'absence complète de la protéine dans les cellules (Moreau et al., 1999; Tsukamoto et al., 2001). De plus, le complexe MRX est normalement impliqué dans le mécanisme de TRD chez la levure (Bucholtz et al., 2001), supportant l'idée que MRX pourrait permettre de créer les extensions 3' G-riche nécessaires au mécanisme de TRD. Par contre, il a été démontré récemment que des mutations dans le domaine nucléase de Mre11p n'a aucun effet sur le mécanisme de TRD qui permet la délétion des répétitions télomériques (Williams et

al., 2005). Présentement, nous ne savons pas si le domaine nucléase de Mre11p est important pour la génération des extensions 3' télomériques et si c'est le cas, quelle serait cette activité (exonucléase et/ou endonucléase). L'utilisation de différents allèles des gènes *MRE11*, *RAD50* et *XRS2* pourrait nous être utile afin de préciser quelle(s) activité(s) nucléase(s) ou autres types d'activités du complexe sont impliquées dans la génération des extensions 3' télomériques. Récemment, le groupe de Matsuura a rapporté qu'une mutation bien précise dans le domaine nucléase de Mre11p provoquerait une diminution importante des signaux sb télomériques à la fin de la phase S (Takata et al., 2005). Par contre, dus aux inconvénients de la synchronisation des cellules en phase S tels que décrits précédemment, les résultats obtenus par ce groupe sont probables mais ne peuvent être concluants. Par ailleurs, bien que Mre11p semble être également important pour la maturation des télomères chez *S.pombe*, le motif phosphoestérase de la protéine ne joue pas de rôle dans ce processus (Tomita et al., 2003).

À part son activité nucléase, il serait possible que le complexe MRX joue un rôle de «checkpoint» aux télomères chez *S.cerevisiae*. En effet, des résultats démontrent que le complexe MRX est impliqué dans un «checkpoint» à l'intérieur de la phase S (intra-S) (D'Amours et Jackson, 2001). De plus, des études d'épistasie sur le gène *TEL1*, encodant une protéine kinase homologue à ATM chez l'humain, démontrent qu'il serait dans la même voie génétique que le complexe MRX et la télomérase (Nugent et al., 1998; Ritchie et al., 1999; Ritchie et Petes, 2000). Tel1p et Mec1p (une protéine kinase homologue à ATR chez l'humain) sont responsables de la

transduction des signaux chez la levure lorsque des perturbations dans l'ADN sont perçues. Elles phosphorylent ainsi les protéines effectrices Rad53p et Chk1p, des protéines kinases hautement conservées qui sont les points centraux de la réponse «checkpoint» (revue dans Viscardi et al., 2005). Il a été démontré que les protéines Mre11p et Xrs2p sont phosphorylées d'une façon dépendante de Tel1p en réponse à des dommages dans l'ADN (D'Amours et Jackson, 2001; Usui et al., 2001; Nakada et al., 2003b). Des expériences d'immunoprécipitation suggèrent que la protéine Mec1p, tout comme le complexe MRX, se retrouve aux télomères de levure à la fin de la phase S, alors que Tel1p serait présent aux télomères lors des autres phases du cycle cellulaire (Takata et al., 2004; Takata et al., 2005). Ainsi, le complexe MRX pourrait agir aux télomères de levure avec Mec1p et/ou Tel1p en tant que «checkpoint» afin de s'assurer que tous les télomères se terminent par une extension 3'. Après la réplication des télomères à la fin de la phase S, ce «checkpoint» détecterait les bouts francs générés aux télomères répliqués par la synthèse du brin avancé et activerait une ou des protéines nucléases afin de reconstituer des télomères fonctionnels. Ainsi, la perte simultanée des fonctions de Mec1p et de Tel1p ou du complexe MRX chez la levure provoque des fusions télomère-télomère (Chan et Blackburn, 2003; Mieczkowski et al., 2003), possiblement à cause de l'incapacité de reconstituer des télomères fonctionnels avec des extensions 3' G-riches après leur réplication.

Une autre possibilité envisagée afin d'expliquer l'action du complexe MRX aux télomères est qu'il agirait avec l'ADN hélicase Sgs1p. Le gène *SGS1* encode une ADN hélicase 3' → 5' qui fait partie de la grande famille des hélicases conservées

RecQ, comprenant entre autres les protéines humaines des syndromes de Werner (WRN) et Bloom (BLM) (revue dans Hickson, 2003). Tout comme le complexe MRX, Sgs1p est impliqué dans un «checkpoint» intra-S de même que dans la formation des survivants de type II (Frei et Gasser, 2000; Cohen et Sinclair, 2001; Huang et al., 2001; Johnson et al., 2001). À l'aide de techniques de gels non-dénaturants, nous avons démontré que des souches mutantes pour le gène *SGS1* possèdent également des extensions 3' télomériques plus courtes que celles des cellules Wt (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées). De même, l'utilisation de la technique d'élongation d'amorces sur les télomères nous a permis de constater que les souches *sgs1Δ* possèdent majoritairement des extensions G-riches de moins de 8 bases, une situation similaire aux souches *mre11Δ* (LeBel, C., M. Larrivée et R.J. Wellinger, données non publiées). De plus, les interactions télomère-télomère dépendantes de la présence d'extensions G-riches sur un plasmide linéaire sont diminuées chez les souches *sgs1Δ* par rapport aux cellules Wt (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées), suggérant une fois de plus que les extensions 3' télomériques sont plus courtes lorsque Sgs1p est absent. Nous avons également obtenu des résultats démontrant que la télomérase n'est pas impliquée dans la création des extensions G-riches résiduelles présentes chez des souches *sgs1Δ* (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées). Ces données appuient une fois de plus l'hypothèse de la présence d'activités nucléases redondantes dans la cellule permettant la formation essentielle des extensions sb télomériques. Comme proposition de modèle, Sgs1p pourrait libérer une partie du brin C-riche télomérique par son activité hélicase et le complexe MRX, via son activité endonucléase, pourrait

cliver ce brin. Une régulation précise du processus permettrait donc de générer des extensions 3' télomériques de 12 à 14 bases chez la levure. En accord avec la possibilité que l'activité hélicase de Sgs1p est importante pour le processus, nous observons une réversion du phénotype lorsqu'une protéine tronquée Sgs1p contenant le domaine hélicase est surexprimée (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées). En effet, le niveau de signaux sb télomériques est augmenté lorsqu'une partie de la protéine Sgs1p est surexprimée, suggérant une action du domaine hélicase de la protéine sur les télomères (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées). Par contre, il faudrait exprimer des protéines Sgs1p contenant des mutations dans le domaine hélicase afin de pouvoir conclure sur ce point. Deux études récentes supportent également la possibilité que Sgs1p agisse en concert avec le complexe MRX. Tout d'abord, des résultats ont démontré que Sgs1p se retrouverait sous forme de gros complexe avec entre autres les protéines Srs2p, Mre11p, Rad50p et Xrs2p (Chiolo et al., 2005). Chez l'humain, il a été démontré que WRN interagit avec le complexe Mre11 via la protéine Nbs1 (l'homologue à Xrs2p) (Cheng et al., 2004). Cependant, des résultats obtenus lors de criblages génétiques à grande échelle indique une létalité et/ou une difficulté de croissance pour des souches doubles mutantes *sgs1Δ mre11Δ*, *sgs1Δ rad50Δ* ou *sgs1Δ xrs2Δ* (Tong et al., 2001; Ooi et al., 2003). De notre côté, nous avons réussi à obtenir des souches *sgs1Δ mre11Δ* (Larrivée, M. et R.J. Wellinger, données non publiées), ce qui laisse croire qu'il y a des différences selon la méthode de construction des souches et/ou un problème relatif au niveau des souches parentales («background») de levure utilisées. La possibilité que Sgs1p et le complexe MRX possèdent de multiples rôles dans la

cellule pourrait également expliquer les phénotypes de faible croissance et/ou létalité synthétique, sans toutefois écarter la possibilité que ces gènes sont épistatiques en ce qui a trait à la génération des extensions sb télomériques.

La complicité des complexes aux télomères

Les complexes yKu et MRX sont impliqués dans la réparation par NHEJ et dans la biologie des télomères. Lors du processus de NHEJ, l'hétérodimère yKu se lie aux cassures d'ADN db afin de moduler la dégradation des extrémités par des nucléases, alors que le complexe MRX semble avoir un rôle de pontage des deux extrémités d'ADN brisées (revue dans Hefferin et Tomkinson, 2005). À la fin de la phase S, il est possible que les télomères soient reconnus comme étant un dommage dans l'ADN par les «checkpoints» (Verdun et al., 2005). Ainsi, yKu70/yKu80 pourrait se lier aux télomères et réguler les processus de dégradation par des nucléases, du moins sur les télomères se terminant par un bout franc. Le complexe MRX serait également impliqué à ce niveau pour la détection des extrémités télomériques non adéquates et/ou pour l'activité nucléase. De plus, le recrutement de Tel1p aux télomères via le complexe MRX pourrait inhiber les événements de fusion télomère-télomère par le mécanisme de NHEJ dépendant de yKu (Chan et Blackburn, 2003; Nakada et al., 2003a). La protéine Sgs1p, qui ne semble pas avoir de rôle dans le mécanisme de NHEJ (Boulton et Jackson, 1998), pourrait être un des facteurs qui permettrait de différencier les rôles des complexes yKu et MRX aux télomères et ceux impliqués dans le NHEJ. Chez l'humain, les protéines WRN et BLM interagissent avec TRF2 et se localisent aux télomères (Johnson et al., 2001; Opresko et al., 2002; Crabbe et al.,

2004; Machwe et al., 2004; Opresko et al., 2004). De plus, WRN interagit avec le complexe MRN via NBS1 (Cheng et al., 2004) alors que les protéines BLM et MRN se retrouvent sous forme de gros complexe de réparation dans la cellule (Wang et al., 2000). Par ailleurs, plusieurs résultats démontrent que le complexe Ku interagit avec WRN (Cooper et al., 2000; Li et Comai, 2000; Orren et al., 2001; Karmakar et al., 2002; Li et al., 2004), de même qu'avec le complexe Mre11 (Goeddecke et al., 1999). Les complexes Ku et MRX pourraient donc recruter Sgs1p (WRN et BLM) aux télomères à la fin de la phase S afin de compléter la maturation des extrémités des chromosomes, c'est-à-dire de générer des extensions 3' G-riches sur tous les télomères. Un autre mécanisme qui pourrait être envisagé est que ces protéines possèdent un rôle au niveau de la réplication adéquate des télomères. En effet, de façon similaire à Sgs1p, les protéines WRN et BLM ont l'habileté de défaire des structures d'ADN formées par des appariements de type G-G (appelées quadruplexes de G) (Sun et al., 1998; Sun et al., 1999; Mohaghegh et al., 2001; Huber et al., 2002). La présence d'un brin riche en G aux télomères pourrait créer de telles structures (Schaffitzel et al., 2001; Chang et al., 2004; Granotier et al., 2005). De récents résultats ont démontré que l'inhibition de la protéine WRN affecte la synthèse du brin retardé aux télomères (Crabbe et al., 2004). C'est en effet cette synthèse qui copie le brin G-riche et qui pourrait alors être inhibée par la présence de structures de quadruplexes de G. De plus, hPot1 interagit avec les protéines WRN et BLM (Opresko et al., 2005) et il peut déstabiliser des quadruplexes de G aux télomères, ce qui permettrait à la télomérase d'agir efficacement aux extrémités des chromosomes (Zaug et al., 2005). De même, le complexe MRX pourrait permettre la réplication

adéquate des télomères en se liant sur ces quadruplexes de G et en participant à la destruction de ces structures inappropriées (Ghosal et Muniyappa, 2005). Finalement, le complexe yKu pourrait aussi avoir des fonctions dans la réplication des télomères. En effet, la synthèse du brin C-riche pourrait se faire de façon inadéquate en absence de l'hétérodimère yKu aux télomères, résultant ainsi à la présence d'extensions 3' télomériques permanentes aux extrémités plutôt que transitoires (Gravel et al., 1998). Ainsi, ces différents complexes pourraient agir dans la régulation et la coordination de la synthèse des brins G- et C-riches afin de maintenir des répétitions télomériques fonctionnelles.

La caractérisation des survivants de type I et de type II

En absence de la télomérase, une faible proportion des cellules de levure réussissent à surpasser la sénescence grâce au maintien des télomères via des mécanismes de recombinaison (revue dans Lundblad, 2002). Deux types de survivants ont été classifiés selon leurs structures télomériques et leur voie de recombinaison respective (Lundblad et Blackburn, 1993; Le et al., 1999; Teng et Zakian, 1999). Les survivants de type I possèdent de très courts télomères (~100 pb) et une très grande amplification des régions sous-télomériques Y', alors que les survivants de type II ont seulement de très longs télomères hétérogènes (voir Introduction, Figure 5). L'apparition des survivants de type I et de type II est dépendante de la présence des gènes *RAD51* et *RAD50* respectivement. Jusqu'à présent, aucune analyse moléculaire n'avait été réalisée chez *S.cerevisiae* afin de tenter d'élucider le ou les mécanismes de recombinaison impliqués dans le maintien des télomères pour les deux types de

survivants. Nous avons tout d'abord analysé la structure terminale retrouvée pour des survivants de type I et II. Dans les deux cas, la structure télomérique est similaire à celle retrouvée pour des cellules Wt (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1). Malgré le fait qu'il y ait de forts signaux sb G-riche pour les survivants de type II, ces signaux restent présents après un traitement à l'exonucléase I, de même qu'il y a absence de bandes distinctes pour les chromosomes en condition non-dénaturante sur gel CHEF («Clamped Homogeneous Electric Field», appelé aussi électrophorèse à champs pulsés). Ceci nous permet de conclure que les survivants de type II ne possèdent pas de longues extensions 3' G-riques (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1). Par contre, nous avons démontré que les survivants de type II possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques selon trois expériences indépendantes : 1) les signaux sb G-riques disparaissent seulement après un traitement à la nucléase mung bean; 2) une grande quantité des signaux sb G-riche se retrouvent dans les puits du gel CHEF; 3) sur gel 2D, il y a la présence d'un arc représentant des molécules circulaires de conformation ouverte («relaxed circles») contenant que des séquences télomériques (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figures 1 et 2). En plus d'être partiellement db, une certaine proportion des cercles d'ADN extra-chromosomiques seraient seulement sb du brin G-riche. Cependant, il est difficile de prédire la migration de telles molécules sur gel 2D, mais on peut noter la présence de forts signaux télomériques qui se retrouvent dans le haut du gel, sur l'arc de migration des molécules linéaires et sur un autre arc formé sous celui des molécules linéaires (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 2). Pour les survivants de type I, nous avons démontré la présence de cercles d'ADN extra-chromosomiques contenant une

ou deux répétitions des éléments Y' (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 2). Ces cercles semblent être majoritairement sous forme db puisque les signaux pour des formes superenroulées («supercoiled») et de conformation ouverte («relaxed circles») sont clairement visibles sur gel 2D (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 2). Cependant, il pourrait y avoir une certaine quantité des molécules qui se retrouvent partiellement sb puisqu'on note sur gel non-dénaturant la présence de faibles signaux sb sensibles seulement au traitement à la nucléase mung bean (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1). Nous avons donc rapporté pour la première fois que les survivants de type I et de type II possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques.

Horowitz et Haber ont démontré que des cercles Y' extra-chromosomiques pouvaient être formés dans des cellules Wt à une très faible fréquence et que ces cercles pouvaient recombiner avec d'autres télomères (Horowitz et Haber, 1985). Ces cercles possèdent une ou deux copies des éléments Y', mais ils sont plutôt instables s'ils ne sont pas maintenus dans la cellule par une pression de sélection (URA^+) (Horowitz et Haber, 1985). Nos résultats démontrent que pour les survivants de type I, les cercles Y' possèdent également une ou deux copies de l'élément sous-télomérique, alors que les survivants de type II n'ont que des cercles contenant des séquences télomériques (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 2). Par contre, ces cercles extra-chromosomiques présents dans les deux cas semblent relativement stables puisqu'ils sont maintenus jusqu'à au moins 280 générations après la formation des survivants (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure supplémentaire 3). Cependant, on ne

peut pas conclure avec ces résultats que les deux types de cercles formés sont utilisés pour la recombinaison afin de maintenir les télomères. L'apparition de ces cercles pourrait être seulement le résultat des produits secondaires formés lors des événements de recombinaison. Des expériences additionnelles, telles que la construction de cercles d'ADN contenant des marqueurs et l'incorporation de ceux-ci dans la levure pourraient nous renseigner sur cette question.

La formation des cercles d'ADN extra-chromosomiques est probablement le résultat d'événements de recombinaison dépendants de Rad52p. La présence de quelques éléments Y' à proximité des télomères favorise la possibilité d'excision de cercles par recombinaison via la grande disponibilité de séquences homologues, une situation observée également au niveau des loci encodant les ARN ribosomiaux (Sinclair et Guarente, 1997). Puisque chaque élément Y' possède un ARS, les cercles Y' peuvent être maintenus dans la cellule via leur réplication autonome. Si les cercles Y' extra-chromosomiques servent de réservoir à la recombinaison, les mécanismes favorisés pour le maintien des télomères chez les survivants de type I seraient l'intégration de molécules d'ADN circulaires db et/ou l'élongation par la méthode de réplication en cercle roulant (voir Introduction, Figure 6, B et C). Dans le premier scénario, les cercles Y' db recombineraient directement avec les éléments Y' aux extrémités des chromosomes, soit via les séquences télomériques ou encore avec le reste des séquences Y' sous-télomériques. Chez la levure *S.cerevisiae*, la longueur minimale des séquences télomériques semble être environ 50 à 100 pb afin d'obtenir un télomère fonctionnel. Les TRFs des survivants de type I sont d'une longueur

d'environ 1 kb, ce qui implique que les télomères possèdent une taille tout près de la valeur critique, soit d'environ 100 pb. Étant donné qu'il n'y a pas de télomérase, les survivants de type I perdent des répétitions télomériques après chaque division cellulaire et les fonctions télomériques seront compromises après seulement quelques divisions. Les télomères non-fonctionnels activeront ainsi les «checkpoints» et un arrêt temporaire en phase G₂/M surviendra. Des événements de réparation/recombinaison seront alors mis en place afin de permettre l'élongation des télomères, mais parfois certaines séquences télomériques pourront être dégradées. Cette dégradation pourrait se prolonger dans la région sous-télomérique adjacente, jusqu'au niveau des prochaines séquences télomériques comprises dans l'élément Y' adjacent. Puisque ces séquences télomériques ont une taille d'environ 100 pb, un nouveau télomère pourra alors entrer en fonction pour les survivants de type I et les cellules repartiront ainsi dans le cycle cellulaire. Pendant ou après ce cycle de dégradation, l'incorporation de cercles Y' pourrait permettre l'ajout de nouveaux éléments Y'. Ces cycles de dégradation de la région Y' proximale au télomère pourraient expliquer la présence d'une traînée des signaux («smear») s'étendant de 5 kb jusqu'à environ 1 kb qui sont toujours observés sur les gels dénaturés pour les survivants de type I (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1 et données non publiées). Par ailleurs, l'arrêt temporaire dans le cycle cellulaire afin de réparer les télomères inactifs pourrait expliquer la croissance ralentie observée des survivants de type I. Pour le deuxième scénario qui permettrait d'expliquer le maintien des télomères pour les survivants de type I, soit par l'utilisation de la réplication en cercle roulant, la présence des cercles monocaténares comme matrice de réplication

permettrait d'expliquer la présence de signaux d'ADN sb sur gel non-dénaturant (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1). En effet, ces signaux correspondent à des poids moléculaires de plus de 5 kpb et ils disparaissent seulement après un traitement de l'ADN avec la nucléase mung bean (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1). En plus des sondes télomériques, ces signaux sont également détectés avec des sondes de séquences Y' (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1 et données non publiées). Par contre, il n'y aurait qu'une petite portion de ces molécules d'ADN sb puisque c'est la forme db qui permet une réplication complète de ces molécules. Étant donné que la majorité des cercles Y' sont sous la forme db, la réplication en cercle roulant pourrait plutôt être initiée par l'invasion de l'extension 3' télomérique (ou des séquences Y') dans la portion db des cercles. Le déplacement des brins permettrait donc de faire l'élongation des extrémités chromosomiques des survivants de type I par la synthèse du brin terminal 3' via la méthode en cercle roulant. Les cercles Y' se retrouveraient alors sous une forme sb de façon transitoire seulement.

Pour les survivants de type II, la formation des cercles monocaténaires G-riches seraient probablement le résultat d'événements de recombinaison intra-chromosomique impliquant une structure similaire au t-loop (Figure 6). Ces événements de recombinaison seraient similaires à ceux proposés pour le mécanisme de TRD (revue dans Lustig, 2003). Ainsi, des cercles d'ADN sb de différentes grosseurs peuvent être produits selon l'étendue du déplacement du brin G et selon l'endroit où l'ADN va être clivé (Figure 6). De plus, des molécules partiellement sb

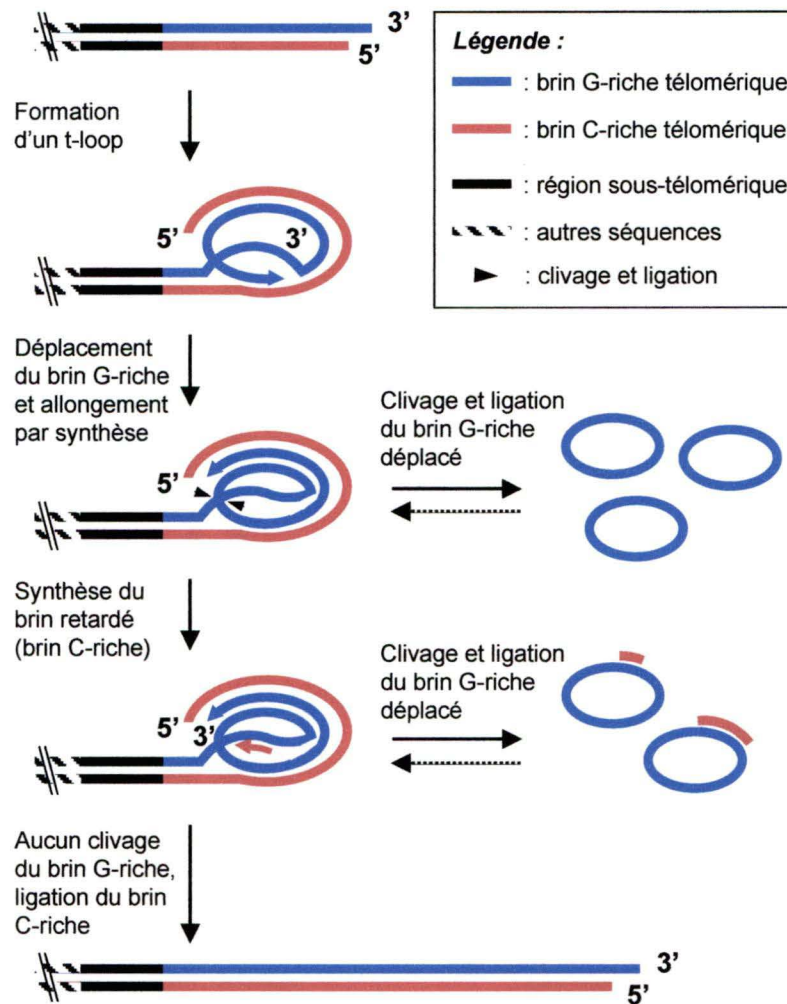


Figure 6. Formation des molécules d'ADN circulaires extra-chromosomiques sb G-riques et/ou partiellement db. Des molécules seulement sb peuvent être générées si le clivage du brin G-riche se réalise avant la synthèse du brin retardé. Les molécules partiellement db sont le résultat de la synthèse du brin C-riche; la longueur de la région d'ADN db est dépendante de l'étendue de la synthèse du brin retardé. Les molécules circulaires générées après les étapes de clivage et de ligation peuvent être de grosseurs différentes selon l'étendue du déplacement du brin G-riche et l'endroit où le clivage a été effectué. À partir des cercles d'ADN extra-chromosomiques, le cheminement inverse (flèches en pointillées) pourrait permettre l'allongement des répétitions télomériques. En effet, la ligation des nouveaux fragments synthétisés du brin C-riche et l'absence de clivage du brin G-riche permettrait d'allonger les télomères des survivants de type II. Note : le clivage et la ligation peuvent avoir lieu à différentes positions sur les deux brins. Ainsi, les molécules partiellement db produites pourraient être seulement le résultat de la coupure et de la ligation des brins télomériques originaux (pas de synthèse du brin retardé).

peuvent apparaître dans la cellule par ce même mécanisme, qui implique soit la synthèse du brin complémentaire C-riche ou soit de l'endroit de coupure et de ligation des brins. La longueur de la région db sur les cercles sera directement proportionnelle à l'étendue de la synthèse du brin retardé (Figure 6) ou à la longueur du brin C-riche télomérique coupé. D'un autre côté, il est possible que Cdc13p se lie sur ces cercles monocaténaire formés et recrute l'ADN polymérase α sur ce substrat (Qi et Zakian, 2000). Encore une fois, des cercles partiellement sb seront créés selon l'étendue de la synthèse du brin C-riche. Par contre, la présence de cercles monocaténaire du brin riche en G pose un certain problème quant au mécanisme envisagé pour l'élongation des télomères des survivants de type II. En effet, l'extension 3' télomérique, qui pourrait servir de point de départ (3'-OH libre) à l'ADN polymérase, est de la même constitution que les cercles sb G-riches. Aucun appariement n'est alors possible afin d'initier le mécanisme de réplication en cercle roulant. Par contre, une des avenues possibles est l'utilisation des cercles partiellement db pour réaliser la réplication en cercle roulant. Dans ce cas-ci, c'est le brin C-riche contenu sur les cercles partiellement db qui serait utilisé comme amorce pour la synthèse. Après quelques cycles d'élongation du brin C-riche, la finition de la synthèse du brin complémentaire (brin G-riche) permettrait alors de former de longues molécules d'ADN db télomériques extra-chromosomiques sous forme linéaire. L'intégration et/ou l'utilisation de ces molécules linéaires aux télomères par le mécanisme de BIR permettraient donc d'augmenter la taille des télomères. En accord avec cette idée, la présence de répétitions télomériques sous forme d'ADN extra-chromosomique linéaire a déjà été rapportée pour des cellules humaines sans télomérase (Ogino et al.,

1998; Tokutake et al., 1998). L'autre possibilité pour expliquer l'allongement des télomères des type II à partir des cercles est l'intégration de ceux-ci au niveau du brin G-riche télomérique. Cette voie se retrouve donc à être l'inverse de celle permettant de former des cercles sb G-riches et/ou partiellement sb (Figure 6). Par contre, l'utilisation de ces cercles sb G-riches comme source de recombinaison pour maintenir les télomères des survivants de type II n'a pas été démontré et il faudrait des expériences supplémentaires pour le prouver. À part la réplication dépendante des cercles et l'intégration des cercles sb, l'élongation des télomères par la formation d'un t-loop est également possible s'il n'y a pas de coupure du brin G (Figure 6). Ce mécanisme nécessite la synthèse du brin C-riche à partir du brin G déplacé, suivi d'une coupure du brin C-riche initial et d'une ligation des molécules produites (Figure 6). Ce mode de réplication pourrait expliquer l'augmentation drastique de la taille des télomères observée chez les survivants de type II de *S.cerevisiae* (Teng et al., 2000).

Chez la levure *Kluyveromyces lactis*, des souches dépourvues de l'activité de la télomérase entrent en sénescence après 50 à 100 divisions et une fraction des cellules peuvent survivre après la crise de façon similaire à *S.cerevisiae* (McEachern et Blackburn, 1996). Par contre, il n'y a qu'un seul type de survivants qui est retrouvé chez *K.lactis*; ils possèdent de très longs télomères hétérogènes et leur formation est grandement affectée en absence du gène *RAD52*, comme dans le cas des survivants de type II chez *S.cerevisiae* (McEachern et Blackburn, 1996). Plusieurs travaux réalisés par le laboratoire de McEachern ont permis d'approfondir les mécanismes impliqués

dans le maintien des télomères en absence de la télomérase chez *K.lactis*. Des résultats ont premièrement démontré que des séquences télomériques contenant un marqueur (un site de restriction pour *BclI*) peuvent se retrouver en plusieurs copies sur un même télomère et également sur la majorité des télomères des survivants de *K.lactis* (Natarajan et McEachern, 2002). Des résultats similaires ont également été obtenus en utilisant des cercles d'ADN télomériques artificiels introduits dans les cellules (Natarajan et McEachern, 2002; Natarajan et al., 2003). Après l'introduction de deux molécules d'ADN circulaires différentes, les auteurs ont démontré que la présence d'intégration multiple des séquences sur un télomère est le résultat d'une seule molécule, suggérant que l'élongation des télomères chez ces survivants est produite par des cercles d'ADN extra-chromosomiques via la méthode de réplication en cercle roulant (Natarajan et McEachern, 2002). Par ailleurs, des données supportent la possibilité d'amplifier des séquences télomériques par l'utilisation des cercles monocaténaire de 100 nt soit du brin G-riche ou soit du brin C-riche (Natarajan et al., 2003). Tout comme pour nos résultats, l'utilisation des cercles sb G-riches chez *K.lactis* apporte une nouvelle dimension pour expliquer le mécanisme. Les auteurs suggèrent la possibilité qu'il y ait une réplication en cercle roulant de façon extra-chromosomique et que les molécules ainsi produites seraient incorporées aux extrémités des chromosomes (Natarajan et al., 2003). Récemment, des évidences directes de la présence de ces cercles extra-chromosomiques ont été rapportées chez *K.lactis* (Groff-Vindman et al., 2005). En effet, des cercles d'ADN télomérique sb du brin G-riche et sous forme db ont été identifiés par gels 2D et par microscopie électronique pour des cellules ayant de longs télomères chez *K.lactis* (Groff-Vindman

et al., 2005). Ces cercles abondants sont de taille se situant entre 100 à 400 nt ou pb selon leur état et leur formation est dépendente de la présence de Rad52p. D'une façon similaire à nous, les auteurs proposent que l'apparition de ces cercles résulterait d'un mécanisme semblable au TRD impliquant une structure t-loop (Groff-Vindman et al., 2005).

Pour les cellules ALT chez l'humain, il a été démontré que des événements de recombinaison permettent des échanges de séquences télomériques entre les différents télomères (Dunham et al., 2000). Comme mentionné plus haut, deux groupes avaient déjà démontré la présence de fragments d'ADN télomérique extra-chromosomique dans ces cellules immortelles sans télomérase (Ogino et al., 1998; Tokutake et al., 1998). Récemment, des évidences très claires sur l'existence de cercles extra-chromosomiques chez l'humain ont été rapportées par deux groupes de recherche (Cesare et Griffith, 2004; Wang et al., 2004). Tout d'abord, le groupe de de Lange a démontré la présence de cercles d'ADN extra-chromosomiques contenant des répétitions télomériques dans diverses lignées de cellules ALT (Wang et al., 2004). Ces cercles migrent en position des molécules circulaires ouvertes («relaxed circles») et une petite fraction se retrouvent comme étant des molécules superenroulées, suggérant que ce sont des molécules partiellement sb et complètement db respectivement. De plus, ce groupe rapporte la présence de cercles extra-chromosomiques lorsqu'un mutant de TRF2, soit TRF2^{ΔB}, est exprimé dans les cellules. Curieusement, l'expression de TRF2^{ΔB} provoque des délétions télomériques importantes sur les chromosomes de façon stochastique, suggérant que ces

événements sont le résultat de recombinaison homologue par l'intermédiaire d'une structure t-loop. De leur côté, Cesare et Griffith ont démontré par microscopie électronique et par technique de gel CHEF à deux dimensions que les cellules ALT possèdent des cercles extra-chromosomiques (Cesare et Griffith, 2004). Ces cercles sont d'une taille de 0,7 à environ 60 kb, ce qui représente une taille similaire à celle observée pour les t-loops des cellules ALT. Ainsi, nos résultats obtenus avec *S.cerevisiae* semblent être similaires à la situation observée des cellules ALT humaines. Toutes ces évidences de la présence des cercles d'ADN extra-chromosomiques chez les différents types de cellules suggèrent fortement qu'ils sont utiles afin de maintenir et d'allonger les télomères. De plus, l'utilisation de cercles contenant des séquences télomériques humaines permettent l'addition de répétitions télomériques, du moins *in vitro* (Lindstrom et al., 2002; Hartig et Kool, 2004; Hartig et al., 2005). Par ailleurs, Nosek *et al.* ont publié dernièrement des évidences sur la réplication en cercle roulant qui se produit à l'aide de cercles extra-chromosomiques aux télomères des mitochondries de la levure *Candida parapsilosis* (Nosek et al., 2005). Finalement, la présence de cercles d'ADN extra-chromosomiques a été rapportée chez d'autres types cellulaires; les insectes (Rosen et al., 2002), les plantes (Bucholc et Buchowicz, 1995), les amphibiens (Cohen et Mechali, 2002), les levures (Tomaska et al., 2000) et d'autres cellules de mammifères (Cohen et al., 1997; Regev et al., 1998; Yeager et al., 1999; Hande et al., 2001).

La survie en absence de Cdc13p

Puisque les télomères des survivants de type I et de type II ne sont pas maintenus par la télomérase, nous avons soulevé l'hypothèse que Cdc13p pourrait avoir un tout autre rôle à jouer dans le maintien des télomères par recombinaison. Afin de vérifier son rôle de protection, nous avons incorporé l'allèle *cdc13-1* dans des souches où le gène *CDC13* a été délété. Après quelques expériences de caractérisation, nous avons démontré qu'une certaine proportion des survivants de types I et de type II peuvent survivre en absence de Cdc13p (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 3 et Figure supplémentaire 2). Ces survivants indépendants de *CDC13* (appelés $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II) possèdent certaines caractéristiques similaires aux survivants de type I et II, mais d'autres phénotypes sont également observés. Puisqu'il n'y a plus de complexe conventionnel jouant le rôle de protection des télomères, il aurait été possible que les survivants $\Delta 13$ -I et/ou $\Delta 13$ -II possèdent des chromosomes circulaires comme dans la situation observée chez *S.pombe* (Nakamura et al., 1998). Or, les chromosomes des cellules $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II sont maintenus sous leur forme linéaire, suggérant que des mécanismes de recombinaison doivent être impliqués pour la survie de ces cellules (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 3 et Figure supplémentaire 1). Les cellules $\Delta 13$ -I possèdent des cercles Y' extra-chromosomiques, mais elles ne démontrent plus un patron de TRFs classique; on ne détecte qu'un «smear» (au lieu de la présence de bandes distinctes) dans les gels dénaturés hybridés avec une sonde Y' ou télomérique (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figures 1-3, Figure supplémentaire 4b). Pour les cellules $\Delta 13$ -II, en plus d'avoir des cercles G-riche sb extra-chromosomiques, elles possèdent également des cercles Y' extra-

chromosomiques de même que de longues extensions télomériques 3' sur leurs chromosomes (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figures 1-3). Le patron des TRFs observé sur gels dénaturés est également altéré pour les cellules $\Delta 13$ -II (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 1, Figure supplémentaire 4b). Lorsque les cellules $\Delta 13$ -II sont cultivées pour plusieurs générations (280 générations), la quantité de cercles G-riches sb extra-chromosomiques semble être diminuée dans ces survivants, suggérant que les cellules $\Delta 13$ -II changent leur mode de recombinaison pour maintenir leur chromosome (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure supplémentaire 3). En effet, ces cellules possèdent également des cercles Y' extra-chromosomiques et c'est probablement vers ce mode de survie que les cellules $\Delta 13$ -II se dirigent. On peut supposer que l'absence de Cdc13p dans ces cellules pourrait rendre les cercles sb G-riches instables puisque Cdc13p ne protégerait plus ces molécules contre la dégradation. Par ailleurs, l'absence de Cdc13p empêcherait le recrutement de l'ADN polymérase α afin d'initier la synthèse du brin C-riche sur ces cercles monocaténares et par le fait même, la formation de molécules linéaires extra-chromosomiques de séquences télomériques serait grandement compromise. Ainsi, les chromosomes ne pourraient être maintenus que par la même voie de recombinaison empruntée par les survivants de type I. De plus, la recombinaison utilisant les cercles Y' extra-chromosomiques serait le meilleur moyen de maintenir les chromosomes sous une forme linéaire en absence de Cdc13p puisque qu'il y a une grande région d'homologie de séquences qui favorise les processus de recombinaison. Par ailleurs, la présence d'extensions sb G-riches télomériques au niveau des chromosomes des cellules $\Delta 13$ -II pourrait refléter un état transitoire dans leur

conversion vers les survivants $\Delta 13$ -I (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 3c). En effet, les longs télomères retrouvés initialement dans les survivants de types II, qui étaient maintenus probablement par la présence de cercles monocaténares G-riches, seraient dégradés et des extensions 3' télomériques pourraient alors être observées transitoirement. Une absence de cercles sb G-riches et d'extensions 3' télomériques dans des cellules $\Delta 13$ -II ayant fait plus de générations que celles analysées ici (> 280 générations) permettrait de valider cette hypothèse.

Adaptation des cellules en absence de Cdc13p

Le maintien des chromosomes sous une forme linéaire en absence de mécanismes de protection conventionnels, qui normalement sont essentiels pour la survie cellulaire, est très étonnant chez la levure. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués, nous avons vérifié la fonctionnalité des «checkpoints» dans ces cellules. Après un court traitement au méthylméthanesulfonate (MMS) qui provoque des dommages dans l'ADN, le niveau de phosphorylation de Rad53p reste inchangé dans les cellules $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II, contrairement aux cellules Wt (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 4a). Cette situation est similaire à celle retrouvée lorsque des cellules sont adaptées à une cassure d'ADN db (voir description au bas); l'activité kinase et la phosphorylation de Rad53p disparaissent dans ce contexte (Pellicioli et al., 2001). Par ailleurs, les cellules $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II sont très sensibles à la présence de MMS et d'hydroxyurée (HU) de façon similaire aux cellules *rad50* Δ , indiquant encore une fois que les «checkpoints» semblent être altérés dans ces survivants (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 4b et Figure supplémentaire

4a). Ce qui est toutefois spectaculaire, c'est que les phénotypes observés sont totalement renversés lorsqu'on introduit une copie du gène *CDC13* dans les survivants $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II. En effet, la réintroduction de *CDC13* dans les cellules $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II rétablit la croissance sur les milieux contenant soit du MMS ou soit du HU, alors que la complémentation seule avec le gène *TLC1* n'a aucun effet (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 4b). De plus, les patrons des TRFs reviennent à ceux des survivants de type I et de type II lorsque Cdc13p est réintroduit dans les cellules $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II respectivement (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure supplémentaire 4b). Lorsque *CDC13* et *TLC1* sont introduits en même temps dans les cellules $\Delta 13$, les télomères des cellules $\Delta 13$ -I redeviennent à une taille similaire à ceux des cellules Wt (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure supplémentaire 4b). Cependant, il y a encore la présence de TRFs de taille plus grande que 1.3 kb dans les cellules $\Delta 13$ -II lors de la complémentation par *TLC1* et *CDC13* (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure supplémentaire 4b). Ceci peut s'expliquer par le fait que ces cellules n'ont pas atteint un nombre de générations assez élevé. En accord avec cette hypothèse, le groupe de Zakian a démontré que les télomères reviennent à une taille d'environ 300 pb seulement lorsque les survivants de type II ont réalisé plus de 200 générations lors de la complémentation (Teng et Zakian, 1999). La réintroduction de *TLC1* seul dans les deux types de survivants $\Delta 13$ n'a aucun effet sur le changement des patrons de TRFs (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure supplémentaire 4b). Ces résultats sur la réversibilité des phénotypes suggèrent fortement que ce n'est pas la présence de mutations dans d'autres gènes qui permet la survie des cellules en absence de Cdc13p. Puisque l'activité des

«checkpoints» revient après la réintroduction de Cdc13p, il semble que les cellules $\Delta 13$ survivent grâce à un processus d'adaptation. En effet, des cellules Wt qui ont une cassure d'ADN db dans un de leurs chromosomes arrêtent dans le cycle cellulaire afin de réparer le dommage. Si le dommage n'est pas réparé après un certain temps, les cellules peuvent alors surpasser cet arrêt causé par les «checkpoints» et repartir leur division cellulaire (Toczyski et al., 1997; Lee et al., 1998). Ces événements, appelés adaptation, semblent être dépendants entre autres de la présence des gènes *YKU70*, *CDC5* (une kinase essentielle pour compléter l'anaphase et une cible de la kinase Rad53p) et *CKB2* (une sous-unité non-essentielle de la caséine kinase II) (Toczyski et al., 1997; Lee et al., 1998). Il serait donc intéressant de vérifier si la survie des cellules $\Delta 13$ est possible lorsqu'une des composantes importantes pour l'adaptation préalablement décrites se retrouve inactive. Par contre, il est probable que l'adaptation réalisée par les cellules $\Delta 13$ soit quelque peu différente de celle préalablement investiguée. En effet, la principale différence est que ce sont les extrémités des chromosomes qui sont en jeu et non des séquences internes des chromosomes. Les extrémités des chromosomes retrouvés dans les cellules $\Delta 13$ possèdent plusieurs répétitions des éléments sous-télomériques Y'. Les cercles Y' extra-chromosomiques peuvent recombiner aux extrémités de chaque chromosomes afin d'amplifier cette région. Il serait alors probable que l'absence de Cdc13p fasse en sorte que les extrémités des chromosomes soient continuellement dégradées par des nucléases résultant à la présence de télomères non fonctionnels dans les cellules. Ainsi, les cycles de dégradation et d'addition des séquences Y' pourraient permettre d'expliquer l'absence de TRFs sur gel pour les cellules $\Delta 13$ (Larrivée et Wellinger,

2005, soumis : Figure 1 et Figure supplémentaire 4b). Les «checkpoints» devraient alors être surpassés et probablement se retrouver sous forme inactive afin de permettre aux cellules $\Delta 13$ de se diviser. Ceci expliquerait aussi pourquoi les cellules $\Delta 13$ sont sensibles aux dommages à l'ADN et que la protéine Rad53p n'est pas phosphorylée lors de la présence de ces dommages (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 4 et Figure supplémentaire 4a). Par contre, il est également possible que le processus d'adaptation soit en quelque sorte différent pour les cellules $\Delta 13$ comparativement à des cellules Wt. En effet, les cellules $\Delta 13$ ont la possibilité de laisser les processus de dégradation/recombinaison avoir lieu au niveau des extrémités des chromosomes, alors que des événements étendus de dégradation à plusieurs kpb d'une cassure d'ADN db à l'intérieur d'un chromosome ne peuvent permettre la survie de cellules normales adaptées sans réparation. De plus, des cellules Wt contenant plus d'une cassure d'ADN ne peuvent s'adapter (Lee et al., 1998) alors que dans le cas des cellules $\Delta 13$, la majorité des extrémités des chromosomes seraient affectées. Il est donc fort probable que les cellules $\Delta 13$ n'aient pas besoin de *YKU70* pour faire l'adaptation, contrairement aux cellules Wt (Lee et al., 1998). Cependant, *CDC5* et/ou *CKB2* pourraient être importants pour la survie des cellules $\Delta 13$. De même, s'il n'y a pas de télomères fonctionnels dans les cellules $\Delta 13$, on peut supposer qu'il n'y aura aucun effet sur la survie cellulaire si on réalise des mutations dans des gènes impliqués seulement au maintien des télomères (ex : *STN1*). Par ailleurs, on peut supposer que Cdc13p jouerait un rôle de protéine «anticheckpoint» aux télomères de levures, comme il a été proposé par Michelson *et al.* (2005). Ainsi, Cdc13p agirait dans les cellules Wt de façon à dissimuler les

télomères pour ne pas qu'ils soient reconnus par les «checkpoints» comme étant des cassures d'ADN db. Toutefois, l'absence de Cdc13p est normalement un processus létal pour la cellule car les télomères sont reconnus par les «checkpoints» et ils sont rapidement dégradés. Les cellules arrêtent donc leur cycle cellulaire et finissent par mourir à cause de la perte de séquences essentielles d'ADN. Pour s'en sortir, les cellules doivent s'adapter, mais l'étendue des dégradations des chromosomes ne permet probablement pas aux cellules Wt de faire plus de quelques divisions (Garvik et al., 1995; Toczyski et al., 1997). Ainsi, le fait que les cellules maintiennent leurs télomères par recombinaison et qu'il y ait la présence d'une quantité importante d'éléments sous-télomériques permettent aux cellules de survivre en l'absence de Cdc13p, à la condition qu'elles mettent leurs «checkpoints» inactifs ou tolérants aux dommages à l'ADN. Par contre, la présence de dommages importants dans l'ADN (ex : MMS) ou tout stress réplcatif (ex : HU) affecte grandement la survie des cellules $\Delta 13$ puisqu'elles n'ont pas le temps de réparer les dégâts causés en absence d'arrêt prolongé dans le cycle cellulaire.

Structure télomérique particulière des survivants

Il a déjà été rapporté que les chromosomes des survivants de type I migrent de façon aberrante sur un gel CHEF (Liti et Louis, 2003). Ce phénotype n'a toutefois pas été expliqué. Nous avons obtenus sensiblement le même patron aberrant de migration pour les chromosomes des survivants de type I, de même que pour les survivants $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figures 1c, 3c et Figure supplémentaire 1). Par contre, la migration des chromosomes dérivés des survivants

de type II donne des bandes distinctes sur gel CHEF de la même façon que pour des cellules Wt. Nous avons donc tenté de mieux caractériser la migration aberrante des chromosomes de survivants. Nous avons ainsi démontré que les extrémités des chromosomes libérées (TRFs) après la digestion avec *NotI* migrent de façon aberrante dans un gel CHEF (présence de «smear» et non de bandes distinctes) pour des survivants de type I, de même que ceux des souches $\Delta 13$ -I et $\Delta 13$ -II (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 5). Par contre, des fragments internes des chromosomes migrent aux positions prédites et donnent des bandes bien distinctes sur le gel CHEF (Larrivée et Wellinger, 2005, soumis : Figure 5c et données non publiées). Ceci nous laisse croire que les extrémités des chromosomes adoptent une structure particulière chez ces survivants. Comme il a déjà été démontré chez les mammifères, une structure similaire au t-loop pourrait expliquer cette migration aberrante (Griffith et al., 1999). En effet, on peut supposer que les cercles Y' extra-chromosomiques présents chez les survivants $\Delta 13$ et de type I pourraient former des associations avec les extrémités des chromosomes, formant alors une structure similaire au t-loop. De même, toute autre structure intermédiaire formée lors d'événements de recombinaison dépendants de Rad51p pourrait expliquer cette mauvaise résolution des extrémités des chromosomes. D'un autre côté, la dérégulation de la longueur des extrémités des chromosomes par les événements de dégradation/recombinaison proposés (décrits précédemment) pourrait aussi expliquer cette migration aberrante. Nous pouvons également remarquer que certains fragments terminaux *NotI* sont beaucoup plus retardés dans le gel CHEF comparativement à ceux obtenus pour les cellules Wt et les survivants de type II (Larrivée et Wellinger,

2005, soumis : Figure 5). Ces tailles élevées peuvent être le résultat d'amplification des éléments sous-télomériques Y' et/ou la présence d'une structure secondaire (ex : t-loop) aux extrémités chromosomiques des survivants de type I et ceux $\Delta 13$. L'utilisation de la microscopie électronique serait la meilleure méthode directe afin de confirmer ou non l'hypothèse de la présence d'une telle structure secondaire aux extrémités des chromosomes chez ces survivants.

CONCLUSION

Nos travaux ont démontré que la structure terminale des télomères chez la levure est constituée d'une courte extension 3' du brin G-riche de 12 à 14 bases à l'extérieur de la phase S. Le complexe Mre11p/Rad50p/Xrs2p est important dans le processus permettant la création de ces extensions chez *S.cerevisiae*. L'implication de ce complexe aux télomères pourrait ainsi permettre la dégradation du brin C-riche aux extrémités se terminant par un bout franc. Toutefois, d'autres facteurs cellulaires seraient impliqués dans la génération des extensions 3' télomériques et restent donc à être identifiés. Nous avons également démontré que le complexe yKu se retrouve aux télomères de levures et qu'il accomplit alors certaines fonctions différentes de celles retrouvées dans le processus de réparation par NHEJ. Finalement, nous avons rapporté que les deux types de survivants, qui maintiennent leurs télomères de façon indépendante à la télomérase, possèdent des cercles d'ADN extra-chromosomiques différents qui pourraient servir de réservoir à la recombinaison. De même, ces mécanismes de recombinaison permettraient le maintien de chromosomes linéaires dans des cellules sans Cdc13p. Toutefois, l'absence d'une protection conventionnelle aux télomères nécessite la mise en place de mécanismes d'adaptation afin de permettre la survie cellulaire. Ainsi, des mécanismes similaires à ceux que nous proposons pourraient être à l'origine de la transformation cellulaire chez l'humain.

REMERCIEMENTS

Je remercie Raymund Wellinger pour son expertise et sa rigueur scientifique. Il a su me transmettre sa passion pour la science dès mes débuts dans le laboratoire. Sa confiance en moi et la latitude qu'il m'a laissée pour réaliser des petits projets «sideline» ont été grandement appréciées et formatrices. Je tiens à remercier les Docteurs Daniel Durocher, Luc Gaudreau et Antonio Conconi pour avoir accepté d'ajouter leurs efforts à ceux de Raymund pour la correction de cette thèse. Merci aux étudiants passés et présents aux laboratoires Wellinger et Chabot. Plus particulièrement, merci à Alain Dandjinou, Martin Toussaint, David Faucher, Stéphane Fiset et Frédéric Dallaire pour nos nombreuses discussions 'scientifiquement' drôles. Merci également à la technicienne Lucie Laliberté qui a fait énormément de petits boulots pour moi, dont remplir mes nombreuses boîtes de tips!

Je remercie Lucie Bolduc de m'avoir grandement soutenu et encouragé lors de ces années d'études. Je lui suis très reconnaissant pour sa patience et sa compréhension pour les nombreuses fois où j'ai dû m'absenter pour aller travailler au CHUS. Merci également à ma famille pour tout leur soutien lors de mes études. Finalement, je remercie le Conseil de Recherche Médicale (CRM) du Canada pour son appui financier.

RÉFÉRENCES

- Adams, A.K. et C. Holm. 1996. Specific DNA replication mutations affect telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 4614-20.
- Adams Martin, A., I. Dionne, R.J. Wellinger, et C. Holm. 2000. The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Mol Cell Biol* **20**: 786-96.
- Alexander, M.K. et V.A. Zakian. 2003. Rap1p telomere association is not required for mitotic stability of a C(3)TA(2) telomere in yeast. *Embo J* **22**: 1688-96.
- Bailey, S.M., M.N. Cornforth, A. Kurimasa, D.J. Chen, et E.H. Goodwin. 2001. Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* **293**: 2462-5.
- Bailey, S.M., J. Meyne, D.J. Chen, A. Kurimasa, G.C. Li, B.E. Lehnert, et E.H. Goodwin. 1999. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14899-904.
- Baumann, P. et T.R. Cech. 2000. Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**: 3265-75.
- Baumann, P. et T.R. Cech. 2001. Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**: 1171-5.
- Baumann, P., E. Podell, et T.R. Cech. 2002. Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing. *Mol Cell Biol* **22**: 8079-87.

- Bertuch, A.A. et V. Lundblad. 2003. The Ku heterodimer performs separable activities at double-strand breaks and chromosome termini. *Mol Cell Biol* **23**: 8202-15.
- Bilaud, T., C. Brun, K. Ancelin, C.E. Koering, T. Laroche, et E. Gilson. 1997. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**: 236-9.
- Blackburn, E.H. et J.G. Gall. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* **120**: 33-53.
- Bosco, G. et J.E. Haber. 1998. Chromosome break-induced DNA replication leads to nonreciprocal translocations and telomere capture. *Genetics* **150**: 1037-47.
- Boule, J.B., L.R. Vega, et V.A. Zakian. 2005. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* **438**: 57-61.
- Boulton, S.J. et S.P. Jackson. 1996. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* **24**: 4639-48.
- Boulton, S.J. et S.P. Jackson. 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J* **17**: 1819-28.
- Bourns, B.D., M.K. Alexander, A.M. Smith, et V.A. Zakian. 1998. Sir proteins, Rif proteins, and Cdc13p bind *Saccharomyces* telomeres in vivo. *Mol Cell Biol* **18**: 5600-8.

- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong, et T. de Lange. 1997. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**: 231-5.
- Bryan, T.M., A. Englezou, J. Gupta, S. Bacchetti, et R.R. Reddel. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* **14**: 4240-8.
- Bryan, T.M., L. Marusic, S. Bacchetti, M. Namba, et R.R. Reddel. 1997. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum Mol Genet* **6**: 921-6.
- Bucholc, M. et J. Buchowicz. 1995. An extrachromosomal fragment of telomeric DNA in wheat. *Plant Mol Biol* **27**: 435-9.
- Bucholc, M., Y. Park, et A.J. Lustig. 2001. Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 6559-73.
- Bundock, P., H. van Attikum, et P. Hooykaas. 2002. Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an *Arabidopsis* KU70 mutant. *Nucleic Acids Res* **30**: 3395-400.
- Carson, M.J. et L. Hartwell. 1985. CDC17: an essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell* **42**: 249-57.
- Cerone, M.A., J.A. Londono-Vallejo, et S. Bacchetti. 2001. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells. *Hum Mol Genet* **10**: 1945-52.

- Cesare, A.J. et J.D. Griffith. 2004. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol* **24**: 9948-57.
- Cesare, A.J., N. Quinney, S. Willcox, D. Subramanian, et J.D. Griffith. 2003. Telomere looping in *P. sativum* (common garden pea). *Plant J* **36**: 271-9.
- Chai, W., L.P. Ford, L. Lenertz, W.E. Wright, et J.W. Shay. 2002. Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J Biol Chem* **277**: 47242-7.
- Chakhparonian, M. et R.J. Wellinger. 2003. Telomere maintenance and DNA replication: how closely are these two connected? *Trends Genet* **19**: 439-46.
- Chamankhah, M., T. Fontanie, et W. Xiao. 2000. The *Saccharomyces cerevisiae* mre11(ts) allele confers a separation of DNA repair and telomere maintenance functions. *Genetics* **155**: 569-76.
- Chan, C.S. et B.K. Tye. 1983a. A family of *Saccharomyces cerevisiae* repetitive autonomously replicating sequences that have very similar genomic environments. *J Mol Biol* **168**: 505-23.
- Chan, C.S. et B.K. Tye. 1983b. Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* **33**: 563-73.
- Chan, S.W. et E.H. Blackburn. 2003. Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell* **11**: 1379-87.
- Chandra, A., T.R. Hughes, C.I. Nugent, et V. Lundblad. 2001. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev* **15**: 404-14.

- Chang, C.C., I.C. Kuo, I.F. Ling, C.T. Chen, H.C. Chen, P.J. Lou, J.J. Lin, et T.C. Chang. 2004. Detection of quadruplex DNA structures in human telomeres by a fluorescent carbazole derivative. *Anal Chem* **76**: 4490-4.
- Chen, Q., A. Ijima, et C.W. Greider. 2001. Two survivor pathways that allow growth in the absence of telomerase are generated by distinct telomere recombination events. *Mol Cell Biol* **21**: 1819-27.
- Cheng, W.H., C. von Kobbe, P.L. Opresko, L.M. Arthur, K. Komatsu, M.M. Seidman, J.P. Carney, et V.A. Bohr. 2004. Linkage between Werner syndrome protein and the Mre11 complex via Nbs1. *J Biol Chem* **279**: 21169-76.
- Chiolo, I., W. Carotenuto, G. Maffioletti, J.H. Petrini, M. Foiani, et G. Liberi. 2005. Srs2 and Sgs1 DNA helicases associate with Mre11 in different subcomplexes following checkpoint activation and CDK1-mediated Srs2 phosphorylation. *Mol Cell Biol* **25**: 5738-51.
- Chong, L., B. van Steensel, D. Broccoli, H. Erdjument-Bromage, J. Hanish, P. Tempst, et T. de Lange. 1995. A human telomeric protein. *Science* **270**: 1663-7.
- Cimino-Reale, G., E. Pascale, E. Alvino, G. Starace, et E. D'Ambrosio. 2003. Long telomeric C-rich 5'-tails in human replicating cells. *J Biol Chem* **278**: 2136-40.
- Cohen, H. et D.A. Sinclair. 2001. Recombination-mediated lengthening of terminal telomeric repeats requires the Sgs1 DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 3174-9.

- Cohen, S. et M. Mechali. 2002. Formation of extrachromosomal circles from telomeric DNA in *Xenopus laevis*. *EMBO Rep* **3**: 1168-74.
- Cohen, S., A. Regev, et S. Lavi. 1997. Small polydispersed circular DNA (spcDNA) in human cells: association with genomic instability. *Oncogene* **14**: 977-85.
- Cohn, M. et E.H. Blackburn. 1995. Telomerase in yeast. *Science* **269**: 396-400.
- Colgin, L. et R. Reddel. 2004. Telomere biology: a new player in the end zone. *Curr Biol* **14**: R901-2.
- Conrad, M.N., J.H. Wright, A.J. Wolf, et V.A. Zakian. 1990. RAP1 protein interacts with yeast telomeres in vivo: overproduction alters telomere structure and decreases chromosome stability. *Cell* **63**: 739-50.
- Cooper, M.P., A. Machwe, D.K. Orren, R.M. Brosh, D. Ramsden, et V.A. Bohr. 2000. Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* **14**: 907-12.
- Counter, C.M., M. Meyerson, E.N. Eaton, et R.A. Weinberg. 1997. The catalytic subunit of yeast telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9202-7.
- Crabbe, L., R.E. Verdun, C.I. Haggblom, et J. Karlseder. 2004. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* **306**: 1951-3.
- d'Adda di Fagagna, F., M.P. Hande, W.M. Tong, D. Roth, P.M. Lansdorp, Z.Q. Wang, et S.P. Jackson. 2001. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* **11**: 1192-1196.

- D'Amours, D. et S.P. Jackson. 2001. The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* **15**: 2238-49.
- D'Amours, D. et S.P. Jackson. 2002. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317-27.
- de Bruin, D., S.M. Kantrow, R.A. Liberatore, et V.A. Zakian. 2000. Telomere folding is required for the stable maintenance of telomere position effects in yeast. *Mol Cell Biol* **20**: 7991-8000.
- de Bruin, D., Z. Zaman, R.A. Liberatore, et M. Ptashne. 2001. Telomere looping permits gene activation by a downstream UAS in yeast. *Nature* **409**: 109-113.
- de Lange, T. 2004. T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 323-9.
- de Lange, T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**: 2100-10.
- Diede, S.J. et D.E. Gottschling. 1999. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. *Cell* **99**: 723-33.
- Diede, S.J. et D.E. Gottschling. 2001. Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr Biol* **11**: 1336-40.
- Dionne, I. et R.J. Wellinger. 1996. Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13902-7.
- Dionne, I. et R.J. Wellinger. 1998. Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res* **26**: 5365-71.

- Downs, J.A. et S.P. Jackson. 2004. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 367-78.
- Driller, L., R.J. Wellinger, M. Larrivee, E. Kremmer, S. Jaklin, et H.M. Feldmann. 2000. A short C-terminal domain of Yku70p is essential for telomere maintenance. *J Biol Chem* **275**: 24921-7.
- DuBois, M.L., Z.W. Haimberger, M.W. McIntosh, et D.E. Gottschling. 2002. A quantitative assay for telomere protection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **161**: 995-1013.
- Dunham, M.A., A.A. Neumann, C.L. Fasching, et R.R. Reddel. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* **26**: 447-50.
- Espejel, S., S. Franco, S. Rodriguez-Perales, S.D. Bouffler, J.C. Cigudosa, et M.A. Blasco. 2002. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J* **21**: 2207-19.
- Evans, S.K. et V. Lundblad. 1999. Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**: 117-20.
- Fan, X. et C.M. Price. 1997. Coordinate regulation of G- and C strand length during new telomere synthesis. *Mol Biol Cell* **8**: 2145-55.
- Fang, G. et T.R. Cech. 1993. Oxytricha telomere-binding protein: DNA-dependent dimerization of the alpha and beta subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 6056-60.
- Fellerhoff, B., F. Eckardt-Schupp, et A.A. Friedl. 2000. Subtelomeric repeat amplification is associated with growth at elevated temperature in yku70 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 1039-51.

- Fisher, T.S., A.K. Taggart, et V.A. Zakian. 2004. Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1198-205.
- Fisher, T.S. et V.A. Zakian. 2005. Ku: A multifunctional protein involved in telomere maintenance. *DNA Repair (Amst)* **4** : 1215-26.
- Ford, L.P., Y. Zou, K. Pongracz, S.M. Gryaznov, J.W. Shay, et W.E. Wright. 2001. Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells. *J Biol Chem* **276**: 32198-203.
- Frei, C. et S.M. Gasser. 2000. The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes Dev* **14**: 81-96.
- Gallego, M.E. et C.I. White. 2001. RAD50 function is essential for telomere maintenance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1711-6.
- Garvik, B., M. Carson, et L. Hartwell. 1995. Single-stranded DNA arising at telomeres in cdc13 mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**: 6128-38.
- Ghosal, G. et K. Muniyappa. 2005. Saccharomyces cerevisiae Mre11 is a high-affinity G4 DNA-binding protein and a G-rich DNA-specific endonuclease: implications for replication of telomeric DNA. *Nucleic Acids Res* **33**: 4692-703.
- Gilley, D., H. Tanaka, M.P. Hande, A. Kurimasa, G.C. Li, M. Oshimura, et D.J. Chen. 2001. DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15084-8.

- Gilson, E., M. Roberge, R. Giraldo, D. Rhodes, et S.M. Gasser. 1993. Distortion of the DNA double helix by RAP1 at silencers and multiple telomeric binding sites. *J Mol Biol* **231**: 293-310.
- Goedecke, W., M. Eijpe, H.H. Offenberg, M. van Aalderen, et C. Heyting. 1999. Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* **23**: 194-8.
- Gotta, M., T. Laroche, A. Formenton, L. Maillet, H. Scherthan, et S.M. Gasser. 1996. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **134**: 1349-63.
- Gottlieb, T.M. et S.P. Jackson. 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**: 131-42.
- Gottschling, D.E., O.M. Aparicio, B.L. Billington, et V.A. Zakian. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**: 751-62.
- Gottschling, D.E. et V.A. Zakian. 1986. Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell* **47**: 195-205.
- Grandin, N., C. Damon, et M. Charbonneau. 2001. Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *Embo J* **20**: 1173-83.
- Grandin, N., S.I. Reed, et M. Charbonneau. 1997. Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev* **11**: 512-27.

- Granotier, C., G. Pennarun, L. Riou, F. Hoffschir, L.R. Gauthier, A. De Cian, D. Gomez, E. Mandine, J.F. Riou, J.L. Mergny, P. Mailliet, B. Dutrillaux, et F.D. Boussin. 2005. Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res* **33**: 4182-90.
- Gravel, S., M. Larrivee, P. Labrecque, et R.J. Wellinger. 1998. Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* **280**: 741-4.
- Gravel, S. et R.J. Wellinger. 2002. Maintenance of double-stranded telomeric repeats as the critical determinant for cell viability in yeast cells lacking Ku. *Mol Cell Biol* **22**: 2182-93.
- Griffith, J.D., L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, et T. de Lange. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**: 503-14.
- Grobelny, J.V., M. Kulp-McEliece, et D. Broccoli. 2001. Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Hum Mol Genet* **10**: 1953-61.
- Groff-Vindman, C., A.J. Cesare, S. Natarajan, J.D. Griffith, et M.J. McEachern. 2005. Recombination at long mutant telomeres produces tiny single- and double-stranded telomeric circles. *Mol Cell Biol* **25**: 4406-12.
- Grossi, S., A. Puglisi, P.V. Dmitriev, M. Lopes, et D. Shore. 2004. Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes Dev* **18**: 992-1006.
- Grunstein, M. 1998. Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* **93**: 325-8.

- Hackett, J.A., D.M. Feldser, et C.W. Greider. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* **106**: 275-86.
- Han, J.O., S.B. Steen, et D.B. Roth. 1997. Ku86 is not required for protection of signal ends or for formation of nonstandard V(D)J recombination products. *Mol Cell Biol* **17**: 2226-34.
- Hande, M.P., A.S. Balajee, A. Tchirkov, A. Wynshaw-Boris, et P.M. Lansdorp. 2001. Extra-chromosomal telomeric DNA in cells from Atm(-/-) mice and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Genet* **10**: 519-28.
- Hardy, C.F., L. Sussel, et D. Shore. 1992. A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev* **6**: 801-14.
- Harley, C.B., A.B. Futcher, et C.W. Greider. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**: 458-60.
- Hartig, J.S., S. Fernandez-Lopez, et E.T. Kool. 2005. Guanine-rich DNA nanocircles for the synthesis and characterization of long cytosine-rich telomeric DNAs. *Chembiochem* **6**: 1458-62.
- Hartig, J.S. et E.T. Kool. 2004. Small circular DNAs for synthesis of the human telomere repeat: varied sizes, structures and telomere-encoding activities. *Nucleic Acids Res* **32**: e152.
- Hecht, A., T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S.M. Gasser, et M. Grunstein. 1995. Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583-92.

- Hefferin, M.L. et A.E. Tomkinson. 2005. Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**: 639-48.
- Hemann, M.T. et C.W. Greider. 1999. G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res* **27**: 3964-9.
- Henderson, E. 1995. Telomere DNA structure. In *Telomeres* (ed. E.H. Blackburn and C.W. Greider), pp. 11-34. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Henderson, E.R. et E.H. Blackburn. 1989. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* **9**: 345-8.
- Henson, J.D., A.A. Neumann, T.R. Yeager, et R.R. Reddel. 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* **21**: 598-610.
- Hickson, I.D. 2003. RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* **3**: 169-78.
- Horowitz, H. et J.E. Haber. 1985. Identification of autonomously replicating circular subtelomeric Y' elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**: 2369-80.
- Horvath, M.P. et S.C. Schultz. 2001. DNA G-quartets in a 1.86 Å resolution structure of an *Oxytricha nova* telomeric protein-DNA complex. *J Mol Biol* **310**: 367-77.
- Horvath, M.P., V.L. Schweiker, J.M. Bevilacqua, J.A. Ruggles, et S.C. Schultz. 1998. Crystal structure of the *Oxytricha nova* telomere end binding protein complexed with single strand DNA. *Cell* **95**: 963-74.

- Houghtaling, B.R., L. Cuttonaro, W. Chang, et S. Smith. 2004. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr Biol* **14**: 1621-31.
- Hsu, H.L., D. Gilley, E.H. Blackburn, et D.J. Chen. 1999. Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 12454-8.
- Hsu, H.L., D. Gilley, S.A. Galande, M.P. Hande, B. Allen, S.H. Kim, G.C. Li, J. Campisi, T. Kohwi-Shigematsu, et D.J. Chen. 2000. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* **14**: 2807-2812.
- Huang, P., F.E. Pryde, D. Lester, R.L. Maddison, R.H. Borts, I.D. Hickson, et E.J. Louis. 2001. SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr Biol* **11**: 125-9.
- Huber, M.D., D.C. Lee, et N. Maizels. 2002. G4 DNA unwinding by BLM and Sgs1p: substrate specificity and substrate-specific inhibition. *Nucleic Acids Res* **30**: 3954-61.
- Hughes, T.R., S.K. Evans, R.G. Weilbaecher, et V. Lundblad. 2000a. The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase. *Curr Biol* **10**: 809-12.
- Hughes, T.R., R.G. Weilbaecher, M. Walterscheid, et V. Lundblad. 2000b. Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 6457-62.
- Ivanov, E.L., N. Sugawara, C.I. White, F. Fabre, et J.E. Haber. 1994. Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**: 3414-25.

- Iwano, T., M. Tachibana, M. Reth, et Y. Shinkai. 2004. Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem* **279**: 1442-8.
- Jaco, I., P. Munoz, et M.A. Blasco. 2004. Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping. *Cancer Res* **64**: 7271-8.
- Jacob, N.K., R. Skopp, et C.M. Price. 2001. G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres. *Embo J* **20**: 4299-308.
- Johnson, F.B., R.A. Marciniak, M. McVey, S.A. Stewart, W.C. Hahn, et L. Guarente. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *Embo J* **20**: 905-13.
- Karlseder, J., D. Broccoli, Y. Dai, S. Hardy, et T. de Lange. 1999. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**: 1321-5.
- Karmakar, P., C.M. Snowden, D.A. Ramsden, et V.A. Bohr. 2002. Ku heterodimer binds to both ends of the Werner protein and functional interaction occurs at the Werner N-terminus. *Nucleic Acids Res* **30**: 3583-91.
- Kibe, T., K. Tomita, A. Matsuura, D. Izawa, T. Kodaira, T. Ushimaru, M. Uritani, et M. Ueno. 2003. Fission yeast Rhp51 is required for the maintenance of telomere structure in the absence of the Ku heterodimer. *Nucleic Acids Res* **31**: 5054-63.
- Kim, S.H., C. Beausejour, A.R. Davalos, P. Kaminker, S.J. Heo, et J. Campisi. 2004. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* **279**: 43799-804.

- Kim, S.H., P. Kaminker, et J. Campisi. 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**: 405-12.
- Kironmai, K.M. et K. Muniyappa. 1997. Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **2**: 443-55.
- Klobutcher, L.A., M.T. Swanton, P. Donini, et D.M. Prescott. 1981. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 3015-9.
- Kraus, E., W.Y. Leung, et J.E. Haber. 2001. Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8255-62.
- Krauskopf, A. et E.H. Blackburn. 1996. Control of telomere growth by interactions of RAP1 with the most distal telomeric repeats. *Nature* **383**: 354-7.
- Krauskopf, A. et E.H. Blackburn. 1998. Rap1 protein regulates telomere turnover in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12486-91.
- Laroche, T., S.G. Martin, M. Gotta, H.C. Gorham, F.E. Pryde, E.J. Louis, et S.M. Gasser. 1998. Mutation of yeast Ku genes disrupts the subnuclear organization of telomeres. *Curr Biol* **8**: 653-6.
- Larrivée, M., C. LeBel, et R.J. Wellinger. 2004. The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**: 1391-6.
- Larrivée, M. et R.J. Wellinger. 2005. Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states. *Nat Cell Biol*: article soumis.

- Le, S., J.K. Moore, J.E. Haber, et C.W. Greider. 1999. RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**: 143-52.
- Lee, S.E., J.K. Moore, A. Holmes, K. Umezū, R.D. Kolodner, et J.E. Haber. 1998. Saccharomyces Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* **94**: 399-409.
- Lei, M., E.R. Podell, P. Baumann, et T.R. Cech. 2003. DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA. *Nature* **426**: 198-203.
- Lei, M., E.R. Podell, et T.R. Cech. 2004. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1223-9.
- Lendvay, T.S., D.K. Morris, J. Sah, B. Balasubramanian, et V. Lundblad. 1996. Senescence mutants of Saccharomyces cerevisiae with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**: 1399-412.
- Lewis, L.K., G. Karthikeyan, J.W. Westmoreland, et M.A. Resnick. 2002. Differential suppression of DNA repair deficiencies of Yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase). *Genetics* **160**: 49-62.
- Li, B. et L. Comai. 2000. Functional interaction between Ku and the werner syndrome protein in DNA end processing. *J Biol Chem* **275**: 28349-52.
- Li, B. et T. de Lange. 2003. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* **14**: 5060-8.

- Li, B. et A.J. Lustig. 1996. A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 1310-26.
- Li, B., S. Navarro, N. Kasahara, et L. Comai. 2004. Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* **279**: 13659-67.
- Li, B., S. Oestreich, et T. de Lange. 2000. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**: 471-83.
- Lin, J. et E.H. Blackburn. 2004. Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA. *Genes Dev* **18**: 387-96.
- Lin, J.J. et V.A. Zakian. 1995. An in vitro assay for *Saccharomyces* telomerase requires EST1. *Cell* **81**: 1127-35.
- Lin, J.J. et V.A. Zakian. 1996. The *Saccharomyces* CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13760-5.
- Lindstrom, U.M., R.A. Chandrasekaran, L. Orbai, S.A. Helquist, G.P. Miller, E. Oroudjev, H.G. Hansma, et E.T. Kool. 2002. Artificial human telomeres from DNA nanocircle templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15953-8.
- Lingner, J. et T.R. Cech. 1996. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10712-7.
- Lingner, J., T.R. Cech, T.R. Hughes, et V. Lundblad. 1997. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11190-5.

- Liti, G. et E.J. Louis. 2003. NEJ1 prevents NHEJ-dependent telomere fusions in yeast without telomerase. *Mol Cell* **11**: 1373-8.
- Liu, D., A. Safari, M.S. O'Connor, D.W. Chan, A. Laegeler, J. Qin, et Z. Songyang. 2004. PTOPI interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* **6**: 673-80.
- Livengood, A.J., A.J. Zaug, et T.R. Cech. 2002. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. *Mol Cell Biol* **22**: 2366-74.
- Llorente, B. et L.S. Symington. 2004. The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* **24**: 9682-94.
- Loayza, D. et T. De Lange. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **423**: 1013-8.
- Loayza, D., H. Parsons, J. Donigian, K. Hoke, et T. de Lange. 2004. DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. *J Biol Chem* **279**: 13241-8.
- Louis, E.J. et J.E. Haber. 1992. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **131**: 559-74.
- Louis, E.J., E.S. Naumova, A. Lee, G. Naumov, et J.E. Haber. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics* **136**: 789-802.
- Lundblad, V. 2002. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene* **21**: 522-31.

- Lundblad, V. et E.H. Blackburn. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**: 347-60.
- Lundblad, V. et J.W. Szostak. 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**: 633-43.
- Lustig, A.J. 2003. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet* **4**: 916-23.
- Machwe, A., L. Xiao, et D.K. Orren. 2004. TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. *Oncogene* **23**: 149-56.
- Makarov, V.L., Y. Hirose, et J.P. Langmore. 1997. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**: 657-66.
- Manolis, K.G., E.R. Nimmo, E. Hartsuiker, A.M. Carr, P.A. Jeggo, et R.C. Allshire. 2001. Novel functional requirements for non-homologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **20**: 210-21.
- Marcand, S., V. Brevet, C. Mann, et E. Gilson. 2000. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* **10**: 487-90.
- Marcand, S., E. Gilson, et D. Shore. 1997. A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**: 986-90.
- Maringele, L. et D. Lydall. 2002. EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev* **16**: 1919-33.
- Masutomi, K., E.Y. Yu, S. Khurts, I. Ben-Porath, J.L. Currier, G.B. Metz, M.W. Brooks, S. Kaneko, S. Murakami, J.A. DeCaprio, R.A. Weinberg, S.A.

- Stewart, et W.C. Hahn. 2003. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* **114**: 241-53.
- McClintock, B. 1939. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**: 405-416.
- McClintock, B. 1941. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* **26**: 234-282.
- McEachern, M.J. et E.H. Blackburn. 1995. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. *Nature* **376**: 403-9.
- McEachern, M.J. et E.H. Blackburn. 1996. Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev* **10**: 1822-34.
- McEachern, M.J. et S. Iyer. 2001. Short telomeres in yeast are highly recombinogenic. *Mol Cell* **7**: 695-704.
- McElligott, R. et R.J. Wellinger. 1997. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J* **16**: 3705-14.
- Michelson, R.J., S. Rosenstein, et T. Weinert. 2005. A telomeric repeat sequence adjacent to a DNA double-stranded break produces an antieckpoint. *Genes Dev* **19**: 2546-59.
- Mieczkowski, P.A., J.O. Mieczkowska, M. Dominska, et T.D. Petes. 2003. Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10854-9.

- Mitton-Fry, R.M., E.M. Anderson, T.R. Hughes, V. Lundblad, et D.S. Wuttke. 2002. Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* **296**: 145-7.
- Miyoshi, T., M. Sadaie, J. Kanoh, et F. Ishikawa. 2003. Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast. *J Biol Chem* **278**: 1924-31.
- Mohaghegh, P., J.K. Karow, R.M. Brosh Jr, Jr., V.A. Bohr, et I.D. Hickson. 2001. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* **29**: 2843-9.
- Moreau, S., J.R. Ferguson, et L.S. Symington. 1999. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **19**: 556-66.
- Moreau, S., E.A. Morgan, et L.S. Symington. 2001. Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics* **159**: 1423-33.
- Moretti, P., K. Freeman, L. Coodly, et D. Shore. 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**: 2257-69.
- Muller, H.J. 1938. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* **13**: 181-95, 198.
- Munoz-Jordan, J.L., G.A. Cross, T. de Lange, et J.D. Griffith. 2001. t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J* **20**: 579-88.

- Murnane, J.P., L. Sabatier, B.A. Marder, et W.F. Morgan. 1994. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *Embo J* **13**: 4953-62.
- Murti, K.G. et D.M. Prescott. 1999. Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14436-9.
- Murzin, A.G. 1993. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *Embo J* **12**: 861-7.
- Myung, K., G. Ghosh, F.J. Fattah, G. Li, H. Kim, A. Dutia, E. Pak, S. Smith, et E.A. Hendrickson. 2004. Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Mol Cell Biol* **24**: 5050-9.
- Nakada, D., Y. Hirano, et K. Sugimoto. 2004. Requirement of the Mre11 complex and exonuclease 1 for activation of the Mec1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **24**: 10016-25.
- Nakada, D., K. Matsumoto, et K. Sugimoto. 2003a. ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* **17**: 1957-62.
- Nakada, D., T. Shimomura, K. Matsumoto, et K. Sugimoto. 2003b. The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. *Nucleic Acids Res* **31**: 1715-24.
- Nakamura, T.M., J.P. Cooper, et T.R. Cech. 1998. Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* **282**: 493-6.

- Natarajan, S., C. Groff-Vindman, et M.J. McEachern. 2003. Factors influencing the recombinational expansion and spread of telomeric tandem arrays in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* **2**: 1115-27.
- Natarajan, S. et M.J. McEachern. 2002. Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol* **22**: 4512-21.
- Nikitina, T. et C.L. Woodcock. 2004. Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *J Cell Biol* **166**: 161-5.
- Nosek, J., A. Rycovska, A.M. Makhov, J.D. Griffith, et L. Tomaska. 2005. Amplification of telomeric arrays via rolling-circle mechanism. *J Biol Chem* **280**: 10840-5.
- Novick, R.P. 1998. Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem Sci* **23**: 434-8.
- Nugent, C.I., G. Bosco, L.O. Ross, S.K. Evans, A.P. Salinger, J.K. Moore, J.E. Haber, et V. Lundblad. 1998. Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**: 657-60.
- Nugent, C.I., T.R. Hughes, N.F. Lue, et V. Lundblad. 1996. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**: 249-52.
- Ogino, H., K. Nakabayashi, M. Suzuki, E. Takahashi, M. Fujii, T. Suzuki, et D. Ayusawa. 1998. Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 223-7.

- Ohki, R., T. Tsurimoto, et F. Ishikawa. 2001. In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol* **21**: 5753-66.
- Olovnikov, A.M. 1973. A theory of marginotomy. *J Theor Biol* **41**: 181-190.
- Ooi, S.L., D.D. Shoemaker, et J.D. Boeke. 2003. DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet* **35**: 277-86.
- Opresko, P.L., P.A. Mason, E.R. Podell, M. Lei, I.D. Hickson, T.R. Cech, et V.A. Bohr. 2005. POT1 stimulates recQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J Biol Chem*.
- Opresko, P.L., M. Otterlei, J. Graakjaer, P. Bruheim, L. Dawut, S. Kolvrå, A. May, M.M. Seidman, et V.A. Bohr. 2004. The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* **14**: 763-74.
- Opresko, P.L., C. von Kobbe, J.P. Laine, J. Harrigan, I.D. Hickson, et V.A. Bohr. 2002. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* **277**: 41110-9.
- Orren, D.K., A. Machwe, P. Karmakar, J. Piotrowski, M.P. Cooper, et V.A. Bohr. 2001. A functional interaction of Ku with Werner exonuclease facilitates digestion of damaged DNA. *Nucleic Acids Res* **29**: 1926-34.
- Parenteau, J. et R.J. Wellinger. 1999. Accumulation of single-stranded DNA and destabilization of telomeric repeats in yeast mutant strains carrying a deletion of RAD27. *Mol Cell Biol* **19**: 4143-52.

- Parenteau, J. et R.J. Wellinger. 2002. Differential processing of leading- and lagging-strand ends at *Saccharomyces cerevisiae* telomeres revealed by the absence of Rad27p nuclease. *Genetics* **162**: 1583-94.
- Paull, T.T. et M. Gellert. 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* **13**: 1276-88.
- Pellicioli, A., S.E. Lee, C. Lucca, M. Foiani, et J.E. Haber. 2001. Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol Cell* **7**: 293-300.
- Pennock, E., K. Buckley, et V. Lundblad. 2001. Cdc13 Delivers Separate Complexes to the Telomere for End Protection and Replication. *Cell* **104**: 387-396.
- Perrem, K., L.M. Colgin, A.A. Neumann, T.R. Yeager, et R.R. Reddel. 2001. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol* **21**: 3862-75.
- Peterson, S.E., A.E. Stellwagen, S.J. Diede, M.S. Singer, Z.W. Haimberger, C.O. Johnson, M. Tzoneva, et D.E. Gottschling. 2001. The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet* **27**: 64-7.
- Pluta, A.F., B.P. Kaine, et B.B. Spear. 1982. The terminal organization of macronuclear DNA in *Oxytricha fallax*. *Nucleic Acids Res* **10**: 8145-54.
- Polotnianka, R.M., J. Li, et A.J. Lustig. 1998. The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* **8**: 831-4.

- Porter, S.E., P.W. Greenwell, K.B. Ritchie, et T.D. Petes. 1996. The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 582-5.
- Price, C.M. 1990. Telomere structure in *Euplotes crassus*: characterization of DNA-protein interactions and isolation of a telomere-binding protein. *Mol Cell Biol* **10**: 3421-31.
- Pryde, F.E., H.C. Gorham, et E.J. Louis. 1997. Chromosome ends: all the same under their caps. *Curr Opin Genet Dev* **7**: 822-8.
- Pryde, F.E. et E.J. Louis. 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *Embo J* **18**: 2538-50.
- Qi, H. et V.A. Zakian. 2000. The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase alpha and the telomerase-associated est1 protein. *Genes Dev* **14**: 1777-88.
- Ranganathan, V., W.F. Heine, D.N. Ciccone, K.L. Rudolph, X. Wu, S. Chang, H. Hai, I.M. Ahearn, D.M. Livingston, I. Resnick, F. Rosen, E. Seemanova, P. Jarolim, R.A. DePinho, et D.T. Weaver. 2001. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* **11**: 962-6.
- Ray, S., Z. Karamysheva, L. Wang, D.E. Shippen, et C.M. Price. 2002. Interactions between telomerase and primase physically link the telomere and chromosome replication machinery. *Mol Cell Biol* **22**: 5859-68.

- Regev, A., S. Cohen, E. Cohen, I. Bar-Am, et S. Lavi. 1998. Telomeric repeats on small polydisperse circular DNA (spcDNA) and genomic instability. *Oncogene* **17**: 3455-61.
- Riha, K., T.D. McKnight, J. Fajkus, B. Vyskot, et D.E. Shippen. 2000. Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures. *Plant J* **23**: 633-41.
- Riha, K. et D.E. Shippen. 2003. Ku is required for telomeric C-rich strand maintenance but not for end-to-end chromosome fusions in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 611-5.
- Riha, K., J.M. Watson, J. Parkey, et D.E. Shippen. 2002. Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in Arabidopsis mutants deficient in Ku70. *Embo J* **21**: 2819-26.
- Ritchie, K.B., J.C. Mallory, et T.D. Petes. 1999. Interactions of TLC1 (which encodes the RNA subunit of telomerase), TEL1, and MEC1 in regulating telomere length in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 6065-75.
- Ritchie, K.B. et T.D. Petes. 2000. The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* **155**: 475-9.
- Rogan, E.M., T.M. Bryan, B. Hukku, K. Maclean, A.C. Chang, E.L. Moy, A. Englezou, S.G. Warneford, L. Dalla-Pozza, et R.R. Reddel. 1995. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* **15**: 4745-53.

- Rosen, M., I. Kamnert, et J.E. Edstrom. 2002. Extrachromosomal RNA-DNA complex containing long telomeric repeats in chironomids. *Insect Mol Biol* **11**: 167-74.
- Roy, R., B. Meier, A.D. McAinsh, H.M. Feldmann, et S.P. Jackson. 2004. Separation-of-function mutants of yeast Ku80 reveal a Yku80p-Sir4p interaction involved in telomeric silencing. *J Biol Chem* **279**: 86-94.
- Samper, E., F.A. Goytisolo, P. Slijepcevic, P.P. van Buul, et M.A. Blasco. 2000. Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* **1**: 244-52.
- Sandell, L.L. et V.A. Zakian. 1993. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**: 729-39.
- Schaffitzel, C., I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H.J. Lipps, et A. Pluckthun. 2001. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8572-7.
- Schramke, V., P. Luciano, V. Brevet, S. Guillot, Y. Corda, M.P. Longhese, E. Gilson, et V. Geli. 2004. RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat Genet* **36**: 46-54.
- Schulz, V.P. et V.A. Zakian. 1994. The saccharomyces PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**: 145-55.
- Shampay, J., J.W. Szostak, et E.H. Blackburn. 1984. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**: 154-7.

- Shay, J.W. et S. Bacchetti. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* **33**: 787-91.
- Shore, D. 1994. RAP1: a protean regulator in yeast. *Trends Genet* **10**: 408-12.
- Shore, D. 1997. Telomerase and telomere-binding proteins: controlling the endgame. *Trends Biochem Sci* **22**: 233-5.
- Sinclair, D.A. et L. Guarente. 1997. Extrachromosomal rDNA circles--a cause of aging in yeast. *Cell* **91**: 1033-42.
- Singer, M.S. et D.E. Gottschling. 1994. TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**: 404-9.
- Singer, M.S., A. Kahana, A.J. Wolf, L.L. Meisinger, S.E. Peterson, C. Goggin, M. Mahowald, et D.E. Gottschling. 1998. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**: 613-32.
- Smogorzewska, A. et T. de Lange. 2004. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* **73**: 177-208.
- Smogorzewska, A., B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M.R. Schaefer, G. Schnapp, et T. de Lange. 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* **20**: 1659-68.
- Stansel, R.M., T. de Lange, et J.D. Griffith. 2001. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J* **20**: 5532-40.
- Stellwagen, A.E., Z.W. Haimberger, J.R. Veatch, et D.E. Gottschling. 2003. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* **17**: 2384-95.

- Strahl-Bolsinger, S., A. Hecht, K. Luo, et M. Grunstein. 1997. SIR2 and SIR4 interactions differ in core and extended telomeric heterochromatin in yeast. *Genes Dev* **11**: 83-93.
- Sun, H., R.J. Bennett, et N. Maizels. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. *Nucleic Acids Res* **27**: 1978-84.
- Sun, H., J.K. Karow, I.D. Hickson, et N. Maizels. 1998. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J Biol Chem* **273**: 27587-92.
- Taggart, A.K., S.C. Teng, et V.A. Zakian. 2002. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**: 1023-6.
- Takata, H., Y. Kanoh, N. Gunge, K. Shirahige, et A. Matsuura. 2004. Reciprocal association of the budding yeast ATM-related proteins Tel1 and Mec1 with telomeres in vivo. *Mol Cell* **14**: 515-22.
- Takata, H., Y. Tanaka, et A. Matsuura. 2005. Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **17**: 573-83.
- Teixeira, M.T., M. Arneric, P. Sperisen, et J. Lingner. 2004. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and - nonextendible states. *Cell* **117**: 323-35.
- Teng, S.C., J. Chang, B. McCowan, et V.A. Zakian. 2000. Telomerase-Independent Lengthening of Yeast Telomeres Occurs by an Abrupt Rad50p-Dependent, Rif-Inhibited Recombinational Process. *Mol Cell* **6**: 947-952.

- Teng, S.C. et V.A. Zakian. 1999. Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8083-93.
- Teo, S.H. et S.P. Jackson. 1997. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *Embo J* **16**: 4788-95.
- Teo, S.H. et S.P. Jackson. 2001. Telomerase subunit overexpression suppresses telomere-specific checkpoint activation in the yeast yku80 mutant. *EMBO Rep* **2**: 197-202.
- Tham, W.H. et V.A. Zakian. 2002. Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene* **21**: 512-21.
- Toczyski, D.P., D.J. Galgoczy, et L.H. Hartwell. 1997. CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* **90**: 1097-106.
- Tokutake, Y., T. Matsumoto, T. Watanabe, S. Maeda, H. Tahara, S. Sakamoto, H. Niida, M. Sugimoto, T. Ide, et Y. Furuichi. 1998. Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **247**: 765-72.
- Tomaska, L., J. Nosek, A.M. Makhov, A. Pastorakova, et J.D. Griffith. 2000. Extragenomic double-stranded DNA circles in yeast with linear mitochondrial genomes: potential involvement in telomere maintenance. *Nucleic Acids Res* **28**: 4479-87.
- Tomita, K., A. Matsuura, T. Caspari, A.M. Carr, Y. Akamatsu, H. Iwasaki, K. Mizuno, K. Ohta, M. Uritani, T. Ushimaru, K. Yoshinaga, et M. Ueno. 2003.

- Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres. *Mol Cell Biol* **23**: 5186-97.
- Tong, A.H., M. Evangelista, A.B. Parsons, H. Xu, G.D. Bader, N. Page, M. Robinson, S. Raghbizadeh, C.W. Hogue, H. Bussey, B. Andrews, M. Tyers, et C. Boone. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* **294**: 2364-8.
- Tsubouchi, H. et H. Ogawa. 2000. Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 2221-33.
- Tsukamoto, Y., J. Kato, et H. Ikeda. 1997. Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Nature* **388**: 900-3.
- Tsukamoto, Y., A.K. Taggart, et V.A. Zakian. 2001. The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. *Curr Biol* **11**: 1328-35.
- Usui, T., H. Ogawa, et J.H. Petrini. 2001. A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* **7**: 1255-66.
- van Steensel, B. et T. de Lange. 1997. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1 [see comments]. *Nature* **385**: 740-3.
- van Steensel, B., A. Smogorzewska, et T. de Lange. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**: 401-13.

- Vega-Palas, M.A., E. Martin-Figueroa, et F.J. Florencio. 2000. Telomeric silencing of a natural subtelomeric gene. *Mol Gen Genet* **263**: 287-91.
- Vega-Palas, M.A., S. Venditti, et E. Di Mauro. 1997. Telomeric transcriptional silencing in a natural context [letter]. *Nat Genet* **15**: 232-3.
- Veldman, T., K.T. Etheridge, et C.M. Counter. 2004. Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr Biol* **14**: 2264-70.
- Venkatesan, R.N. et C. Price. 1998. Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 14763-8.
- Verdun, R.E., L. Crabbe, C. Haggbloom, et J. Karlseder. 2005. Functional Human Telomeres Are Recognized as DNA Damage in G2 of the Cell Cycle. *Mol Cell* **20**: 551-561.
- Virta-Pearlman, V., D.K. Morris, et V. Lundblad. 1996. Est1 has the properties of a single-stranded telomere end-binding protein. *Genes Dev* **10**: 3094-104.
- Viscardi, V., M. Clerici, H. Cartagena-Lirola, et M.P. Longhese. 2005. Telomeres and DNA damage checkpoints. *Biochimie* **87**: 613-24.
- Walker, J.R., R.A. Corpina, et J. Goldberg. 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**: 607-14.
- Walmsley, R.W., C.S. Chan, B.K. Tye, et T.D. Petes. 1984. Unusual DNA sequences associated with the ends of yeast chromosomes. *Nature* **310**: 157-60.
- Wang, R.C., A. Smogorzewska, et T. de Lange. 2004. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**: 355-68.

- Wang, S.S. et V.A. Zakian. 1990. Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol Cell Biol* **10**: 4415-9.
- Wang, Y., D. Cortez, P. Yazdi, N. Neff, S.J. Elledge, et J. Qin. 2000. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* **14**: 927-39.
- Watson, J.D. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**: 197-201.
- Wei, C. et C.M. Price. 2004. Cell cycle localization, dimerization, and binding domain architecture of the telomere protein cPot1. *Mol Cell Biol* **24**: 2091-102.
- Weinert, T.A. et L.H. Hartwell. 1988. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**: 317-22.
- Weinert, T.A., G.L. Kiser, et L.H. Hartwell. 1994. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* **8**: 652-65.
- Wellinger, R.J., K. Ethier, P. Labrecque, et V.A. Zakian. 1996. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**: 423-33.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, et V.A. Zakian. 1993a. Origin activation and formation of single-strand TG1-3 tails occur sequentially in late S phase on a yeast linear plasmid. *Mol Cell Biol* **13**: 4057-65.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, et V.A. Zakian. 1993b. *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* **72**: 51-60.
- Wellinger, R.J., A.J. Wolf, et V.A. Zakian. 1993c. Structural and temporal analysis of telomere replication in yeast. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 725-32.

- Wellinger, R.J. et V.A. Zakian. 1989. Lack of positional requirements for autonomously replicating sequence elements on artificial yeast chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 973-7.
- Williams, B., M.K. Bhattacharyya, et A.J. Lustig. 2005. Mre 11 p nuclease activity is dispensable for telomeric rapid deletion. *DNA Repair (Amst)* **4**: 994-1005.
- Wotton, D. et D. Shore. 1997. A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**: 748-60.
- Wright, J.H., D.E. Gottschling, et V.A. Zakian. 1992. *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* **6**: 197-210.
- Wright, W.E., V.M. Tesmer, K.E. Huffman, S.D. Levene, et J.W. Shay. 1997. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**: 2801-9.
- Yang, Q., Y.L. Zheng, et C.C. Harris. 2005. POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. *Mol Cell Biol* **25**: 1070-80.
- Ye, J.Z., J.R. Donigian, M. van Overbeek, D. Loayza, Y. Luo, A.N. Krutchinsky, B.T. Chait, et T. de Lange. 2004a. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**: 47264-71.
- Ye, J.Z., D. Hockemeyer, A.N. Krutchinsky, D. Loayza, S.M. Hooper, B.T. Chait, et T. de Lange. 2004b. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* **18**: 1649-54.

- Yeager, T.R., A.A. Neumann, A. Englezou, L.I. Huschtscha, J.R. Noble, et R.R. Reddel. 1999. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* **59**: 4175-9.
- Zaug, A.J., E.R. Podell, et T.R. Cech. 2005. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10864-9.
- Zhou, J., K. Hidaka, et B. Futcher. 2000a. The Est1 subunit of yeast telomerase binds the Tlc1 telomerase RNA. *Mol Cell Biol* **20**: 1947-55.
- Zhou, J., E.K. Monson, S. Teng, V.P. Schulz, et V.A. Zakian. 2000b. Pif1p helicase, a catalytic inhibitor of telomerase in yeast. *Science* **289**: 771-4.
- Zhou, X.Z. et K.P. Lu. 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* **107**: 347-59.
- Zhu, X.D., B. Kuster, M. Mann, J.H. Petrini, et T. Lange. 2000. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**: 347-52.
- Zubko, M.K., S. Guillard, et D. Lydall. 2004. Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* **168**: 103-15.

ANNEXE

Autres manuscrits publiés

Driller, L., R.J. Wellinger, M. Larrivée, E. Kremmer, S. Jaklin, et H.M. Feldmann. 2000. A short C-terminal domain of Yku70p is essential for telomere maintenance. *J Biol Chem* **275**: 24921-7.

Dandjinou, A.T., M. Larrivée, R.E. Wellinger, et R.J. Wellinger. 2005. Two-dimensional agarose gel analysis of DNA replication intermediates. *Methods Mol Biol* **313**: 193-208.

Lebel, C., M. Larrivée, A. Bah, N. Laterreur, N. Lévesque, et R.J. Wellinger. 2005. Assessing telomeric phenotypes. *Methods Mol Biol* **313**: 265-316.